



**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
Site Pitié-Salpêtrière
Responsable : Pr Vincent JARLIER

Laboratoire associé

Laboratoire de Bactériologie- Hygiène
Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal
Site Lariboisière
Responsable : Pr Emmanuelle CAMBAU

Rapport d'activité pour l'année 2016

Avril 2017

Table des matières

Fiche d'identité du laboratoire coordonnateur et du laboratoire associé du CNR-MYRMA.....	1
Résumé analytique des résultats 2016 et mise en perspective.....	2
1. Missions et organisation du CNR-MyRMA. Techniques disponibles.....	13
1.1. Missions et organisation.....	13
1.2. Techniques introduites en 2016.....	13
2. Activités d'expertise menées en 2016.....	17
2.1. Champs des activités d'expertise sur les souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA en 2016.....	17
2.2. Identification des souches.....	18
2.3. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques.....	21
2.4. Détection de mutations impliquées dans la résistance acquise aux antibiotiques.....	30
3. Activités de surveillance.....	41
3.1. Surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux.....	41
3.2. Surveillance de la lèpre en France.....	54
3.3. Etude génotypique des souches de <i>M.tuberculosis</i> : détection et investigation des cas groupés.....	54
4. Alertes.....	66
4.1. Tuberculose.....	66
4.2. Mycobactérioses.....	66
5. Activités de d'information, de formation et de conseil	68
5.1. Information.....	68
5.2. Formation.....	68
5.3. Activités de conseil.....	69
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR-MyRMA.....	75
6.1. Travaux de recherche 2016 ou en cours.....	75
6.2. Publications et communications.....	81
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiènes alimentaires et environnementale.....	86
7.1. Santé animale.....	86
7.2. Environnement.....	86
8. Programme d'activité pour les années à venir.....	88
Annexe 1 : Missions, équipes, locaux, équipements, démarche qualité.....	98
1. Missions : cahier des charges de l'appel d'offre pour la période 2012-2016.....	98
2. Equipes.....	99
3. Locaux.....	100
4. Principaux équipements.....	100
5. Démarche qualité.....	102
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR-MyRMA.....	105

1. Technique de référence disponibles du CNR-MyRMA.....	105
2. Marqueurs épidémiologiques disponibles.....	107
3. Collections de souches de référence.....	107
4. Liste des techniques (diagnostic/identification, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR-MyRMA pour les laboratoires de Bactériologie médicale désirant pratiquer la mycobactériologie.....	108

Annexe 3 : Cas de tuberculose multirésistante, rapports trimestriels pour les autorités sanitaires : rapport envoyé en février 2016.....	110
---	------------



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

- **Laboratoire coordonnateur**

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris)

Site Pitié-Salpêtrière

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@aphp.fr

Responsable administratif : Mr Serge MOREL, Directeur du groupe hospitalier, assisté de Mme Béatrice LE BALANGER, gestion financière

- **Laboratoire associé**

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris)

Site Lariboisière

2, rue Ambroise Paré

75010 Paris

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@aphp.fr

Responsable administratif : Mme Bénédicte ISABEY, Directrice de l'hôpital Lariboisière-Fernand Widal, Directrice adjointe du Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal, assistée de Mme Marie Noëlle PHILIPPON, gestion financière.



Résumé analytique des résultats 2016 et mise en perspective

1. Structure du CNR-MyRMA en 2016

Le CNR-MyRMA repose sur 2 laboratoires de bactériologie médicale

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

Un laboratoire associé : laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière à Paris, **site Lariboisière**, responsable **Pr Emmanuelle Cambau**.

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

Ces deux laboratoires mettent aussi en commun des centres d'intérêt complémentaires :

Laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour *M.tuberculosis* ; surveillance épidémiologique des infections à travers les réseaux partenaires ; conseils thérapeutiques pour les infections inhabituelles (ex. tuberculose MDR...).

Laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour les mycobactéries non tuberculeuse et *M.leprae* ; mycobactériologie environnementale ; conseils et alertes pour les infections liées aux soins ou à un réservoir environnemental ; tests immunologiques de la tuberculose.

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

Le CNR-MyRMA dispose d'équipes médicales et techniques

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

- 1 PU-PH chef de service, 1 PU-PH adjoint, 3 MCU-PH, et 1 PH du service de Bactériologie-Hygiène du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix et Université Paris 6 (AP-HP (1,45 ETP, financement APHP)
- **1 médecin contractuel (PHC, 1ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **2 techniciens financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (2 ETP)**
- 2 techniciens (1 ETP, financement AP-HP)
- 1 secrétaire (0,25 ETP, financement AP-HP)
- 1 cadre (0,1 ETP, financement AP-HP)
- 1 technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 animalier (financement fonds associatifs)



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Laboratoire associé (Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière)

- 1 PU-PH chef de service et 1 PH, du service de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière et Université Paris 7 (0,35 ETP, financement AP-HP)
- **1 praticien attaché (0,1 ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **1 Technicien financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (1 ETP)**
- 2 Techniciens (0,5 ETP, financement AP-HP)

Le CNR-MyRMA s'appuie sur 2 réseaux partenaires

Le réseau Azay-Mycobactéries

Depuis 1995, le CNR-MyRMA conduit la surveillance annuelle de la **résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux** grâce à la collaboration volontaire d'une **quarantaine de laboratoires hospitalo-universitaires** couvrant toutes les régions métropolitaines sauf la Corse qui n'a pas de CHU. La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour ce qui est du recueil des informations cliniques et des résultats des épreuves de sensibilité aux antibiotiques de première ligne.

La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis publiés qui ont montré que la sensibilité du réseau et la concordance des données avec celles de la DO étaient satisfaisantes.

Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~1.500 cas de tuberculose /an.

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, à travers le réseau créé spécifiquement pour cela et qui réunit **l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (~220 en 2016)**, la surveillance annuelle à visée exhaustive du nombre de cas de **tuberculose bactériologiquement confirmée** (culture positive) et, parmi ces cas, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (« **multirésistants** » ou **MDR**).

Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller certaines formes particulières de tuberculose (**méningites, M. bovis...**).

Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~4.200 cas de tuberculose /an.

Le CNR-MyRMA est adossé à des unités de recherche labélisés

Laboratoire coordinateur

Equipe INSERM « Mécanismes d'émergence et de diffusion de la multirésistance chez les Mycobactéries et les entérobactéries » intégrée à l'UMRS CR7-INSERM 1135 « Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI) », Paris 6, site Pitié-Salpêtrière).

Laboratoire associé

UMR1137 IAME, Paris 7.

2. Améliorations techniques en 2016

Mise en place du séquençage du génome entier de *M.tuberculosis*

L'augmentation du nombre de gènes à séquencer pour la détermination de l'antibiogramme moléculaire des souches MDR et l'analyse MIRU-VNTR pour la phylogénie et la recherche des cas liés (dont le pouvoir discriminant est insuffisant pour certaines lignées, en particulier Beijing) justifient de développer le séquençage du génome (Whole Genome Sequencing, WGS) De nombreuses solutions techniques robustes permettent aujourd'hui de réaliser le séquençage et l'assemblage de génomes complets et l'analyse des résultats, mais à des coûts et délais très variables selon les approches et les plateformes.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Notre activité en 2016 s'est centrée sur l'implantation du séquençage et de l'analyse des génomes complets de souches MDR de *M. tuberculosis* dans un contexte de routine, parallèlement à nos travaux de recherche (cf section 5).

Nous avons tout d'abord poursuivi l'évaluation des moyens bio-informatiques disponibles pour l'analyse des données issues du séquençage génomique ce qui a montré que la fiabilité des séquences génomiques reconstruites à partir du WGS est meilleure lorsque les données obtenues par BioNumerics et PhyResSE sont combinées dans le but de vérifier individuellement les positions nucléotidiques discordantes.

Nous avons ensuite évalué la robustesse des données obtenues par séquençage des génomes complets de plusieurs souches MDR Beijing à partir de 2 prestataires extérieurs : GATC Biotech (European Genome and Diagnostics Centre, Constance, Allemagne) et GenoScreen (Lille). Cette analyse a permis d'optimiser le paramétrage des logiciels d'assemblage dans le but d'éliminer ces faux-SNP.

Nous avons participé au contrôle qualité Européen (CQE) « Next Generation Sequencing » organisé par l'ECDC et piloté par le RIVM (R. Anthony, Tuberculosis Reference Laboratory, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands). Tous les SNP (mutations, insertions et délétions) impliqués dans la résistance aux anti-tuberculeux ont été correctement identifiés.

Nous avons enfin enclenché un programme d'envoi régulier à la société GenoScreen de suspensions d'ADN préparées à partir des souches de *M. tuberculosis* MDR reçues au CNR pour analyse des génomes complets (4.411.532 paires de bases par génome). En 2016, 65 génomes ont été déterminés et analysés pour détection des SNPs, identification des mutations associées à la résistance, spoligotypage sur base de séquençage et comparaison des échantillons par l'analyse phylogénétique comme montré dans le schéma ci-dessous.

Evaluation d'une nouvelle méthode pour la recherche directe de *M.tuberculosis* sur prélèvement

Le nouveau test FluoroType MTB (Hain, Lifescience, Allemagne) est un test semi-automatisé développé pour la détection rapide du complexe *M. tuberculosis* à partir de prélèvements par amplification en temps réel et détection des cibles par sondes HyBeacon sur thermocycleur FluoroCycler-12 (système fermé qui limite les risques de contamination rencontrés avec l'approche « bandelette »). L'évaluation de la performance du test est en cours depuis octobre 2016.

Détermination de la sensibilité phénotypique de la bédaquiline en milieu solide 7H11

La détermination de la sensibilité phénotypique de la bédaquiline par la méthode de référence (méthode des proportions) est réalisée, depuis 2016, en milieu agar Middlebrook 7H11 (milieu préparé et contrôlé par le CNR-MyRMA) aux concentrations de 0,12 et 0,25 mg/L selon les recommandations du fabricant et de l'EUCAST.

Nouvelle stratégie pour l'identification des mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide

En 2016, nous avons modifié l'algorithme suivi pour l'identification des mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide, grâce à l'implantation en routine de deux techniques évaluées précédemment : l'identification par spectrométrie Maldi-Tof, et le test GenoType NTMDR qui permet non seulement de détecter la résistance acquise des MNT aux macrolides et aux aminosides mais aussi d'identifier les espèces *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. chelonae*, et *M. abscessus*.

La nouvelle stratégie lors de cas d'infections à MNT à croissance rapide est maintenant la suivante : identification par Maldi-Tof puis (a) si score satisfaisant et espèces listée ci-dessus et antécédent de traitement antibiotique : test GenoType NTM-DR, (b) si score insatisfaisant : test GenoType CM et AS puis identification par PCR-séquence du gène hsp65, complété de rpoB si besoin.

Nouvelle organisation pour le diagnostic bactériologique de la lèpre

Nous avons revalidé les techniques de routine : préparation des suspensions à partir des biopsies, examen microscopique avec coloration de Ziehl Neelsen, extraction d'ADN, PCR RLEP, et test GenoType LepraeDR pour la détection de la résistance à la rifampicine, la dapsonne et l'ofloxacine.



3. Contrôle de qualité – Accréditation

Le CNR-MyRMA a participé en 2016 à des contrôles de qualité externe (CQE) européens: (a) prélèvements et souches pour examen microscopique, culture, identification, tests de sensibilité, amplification génique et détection moléculaire de la résistance, CQE organisé par la société Instand (Dusseldorf, Allemagne) dans le cadre du réseau européen des CNR de tuberculose et mycobactéries ERLN-TB (ECDC); (b) suspensions d'ADN de *M.tuberculosis* pour génotypage MIRU-VNTR, CQE organisé par le RIVM (Bilthoven, Pays-Bas) dans le cadre du « Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis ». **Les résultats étaient conformes.**

Les deux laboratoires du CNR-MyRMA se sont inscrits depuis quatre ans dans la **démarche d'accréditation** dans le cadre du processus général enclenché par les Pôles de biologie médicale de leur hôpital respectif. **Chacun des deux laboratoires est, tout au long du processus, accrédité à travers le pôle de biologie médicale auquel il appartient, considéré par le COFRAC comme un laboratoire unique.**

4. Nombre de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA et nombre d'analyses faites en 2016

Le nombre total de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA en 2016 (n=1.014) chiffre globalement stable depuis 2010 (n= 1000-1200).

Le CNR-MyRMA a effectué en 2016 **plus de 6.600 analyses** génotypiques (gènes étudiés pour identification ou recherche de mutations de résistance) et tests phénotypiques (antibiotiques testés) ainsi que **158 études génétiques complexes** pour comparaisons de souches (génotypage).

Il faut noter une augmentation importante depuis 2010 des activités d'expertise menées sur chaque souche et prélèvement reçus, liée d'une part à l'évolution des techniques et des connaissances et d'autre part à la complexification des besoins thérapeutiques, ce qui s'est traduit par :

- **un doublement** du nombre de souches soumises à étude génotypique de résistance
- **+34%** du nombre de souches de *M.tuberculosis* soumises à un **antibiogramme de 1^{ère} ligne**,
- **+29%** du nombre de souches de *M.tuberculosis* soumises à un **antibiogramme de 2^{ème} ligne**, qui demande beaucoup de travail par l'utilisation de nombreux milieux de culture spécifiques non commercialisés, qui doivent donc être préparés localement puis soumis à des contrôles de qualité,
- **Un triplement** du nombre de biopsies soumises à la détection de *M.leprae* et du nombre de souches identifiées et analysées génotypiquement.

5. Principaux résultats des expertises menées sur les souches reçues en 2016

5.1. Identification des espèces

M. tuberculosis complex

- La moitié des 393 souches du complexe *M.tuberculosis* reçues pour identification ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce : **87% *M.tuberculosis***, principale espèce responsable de tuberculose humaine, **2% *M.bovis*** et **5% *M.africanum***, proportions stables depuis plusieurs années. Pour ces deux dernières espèces, la proportion est surestimée car l'identification jusqu'au niveau de l'espèce à partir des souches reçues est essentiellement entreprise au CNR pour les souches non typiques de l'espèce *M.tuberculosis* (souches lisses, dysgoniques...). Cf. ci-après pour une évaluation plus précise du nombre de tuberculoses à *M.bovis*. A noter une petite augmentation depuis 2012 du nombre de souches de ***M.bovis* var BCG**.

Mycobactéries non tuberculeuses

- distribution des 359 souches reçues pour identification : **43% complexe *M.avium-intracellulare***, 10% *M.xenopi*, 4% *M.kansasii*, **27% espèces dites « à croissance rapide »**, (*M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*), 13 % espèces rares ou nouvellement décrites.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

- **79% des souches ont été considérées comme responsables d'infections**, pourcentage élevé en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses efforts sur les souches importantes au plan médical.
- 6 souches étaient isolées **d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans**, en diminution par rapport aux années antérieures, indicateur surveillé dans le cadre du **suivi des infections à mycobactéries non tuberculeuses depuis de l'obligation vaccinale par le BCG en 2007**.

5.2. Résistance phénotypique acquise des souches reçues en 2016

M. tuberculosis

- **70% des 185 souches de *M. tuberculosis* reçues pour tests de sensibilité aux antituberculeux de 1^{ère} ligne étaient résistantes à au moins de ces antituberculeux** (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine), parmi lesquels **la moitié étaient multirésistantes (MDR)** c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et la rifampicine. Ces chiffres sont très différents de ceux générés par la surveillance systématique menée à travers les deux réseaux partenaires du CNR (cf § 6.2. ci-après) et ce n'est donc **pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour expertise que l'on peut établir des statistiques représentatives de résistance en France** car ces souches sont souvent adressées précisément pour suspicion de résistance. **En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise des mécanismes de résistance prévalents en France.**
- La confrontation du nombre de souches MDR reçues pour expertise et des données issues de la surveillance spécifique à visée exhaustive à travers le réseau du CNR-MyRMA permet de déduire que le **CNR reçoit la totalité des souches MDR-XDR identifiées en France, ce qui en permet une étude exhaustive.**
- **Augmentation du nombre total de souches MDR depuis 2010** : ce nombre, qui était resté stable entre 2006 et 2010 autour de ~50 par an, a atteint 50-100 par an depuis 2012, ce qui est lié aux patients nés dans les pays d'ex-URSS et d'Europe de l'Est (~10 /an en 2006 – 2010, 20 à 60 depuis).
- Le nombre de **cas MDR de patients nés en France ou en Europe de l'ouest**, rares jusqu'en 2013 (≤ 10 /an), a **augmenté depuis 2014** (~20/an).
- **Résistance aux principaux antituberculeux de 2^{ème} ligne parmi les souches MDR** : 20% à au moins un des 3 aminosides de réserve (kanamycine, amikacine, capréomycine) dont la moitié aux 3, et 17% aux fluoroquinolones.
- La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **aussi** aux fluoroquinolones et à au moins un aminoside de réserve (**XDR**) était de **8%** soit **6 cas** (0 à 3/an de 2000 à 2008, 4 à 6 en 2009-11, 17 à 26 en 2012-14 mais retour à 6-10 en 2015-16).
- Très basses proportions de souches résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine parmi les souches reçues dans un contexte autre que la multirésistance (ex. suspicion initiale de multirésistance non confirmée, effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine...) : **0% à l'amikacine ou aux fluoroquinolones, 5% à l'éthambutol ou au PAS.**

Mycobactéries non tuberculeuses

Au sein des **266 souches** reçues pour tests de sensibilité, **la résistance acquise n'est trouvée que chez les souches de patients déjà traités (résistance 2^{aire} par sélection de mutants résistants sous traitement)** : (a) clarithromycine : 7% chez *M.avium-intracellulare complex*, 0% chez *M.xenopi*, 2/13 *M.abscessus subsp massiliense* ; (b) amikacine 5% chez les espèces à croissance rapide ; (c) 0% à la rifampicine chez *M.kansasii* et *M.xenopi*.

5.3. Mutations impliquées dans la résistance acquise chez les souches reçues en 2016

En 2016, nous avons recherché les **mutations** impliquées dans la résistance pour **461 souches** (285 *M. tuberculosis*, 150 mycobactéries non tuberculeuses, 26 *M.leprae*).

***M. tuberculosis* (1.735 tests génomiques)**

Principales mutations (répartition stable ces dernières années) : gène *rpoB* chez **toutes** les souches résistantes à la rifampicine (dont 2/3 mutation S531L) ; ¾ de mutations S315T dans *katG* (résistance de haut niveau), et/ou région régulatrice du gène *inhA* (1/4) (dont 15% de mutation isolée dans ce gène ce qui génère une résistance de bas niveau) pour l'isoniazide ; grande diversité des mutations dans le gène *pncA* pour le pyrazinamide ; position 306 du gène *emB* pour l'éthambutol ; gènes *gyrA* (84%), essentiellement à la position 94, ou *gyrB* (16%) chez **toutes** les souches résistantes aux fluoroquinolones ; grande diversité de mutations dans le gène *ethA* pour l'éthionamide (plus



fréquent = délétions) ; gène *rrs* pour les aminosides.

Mycobactéries non tuberculeuses (324 tests génomiques)

Mutations dans le gène *rrl* codant l'ARN 23S pour la clarithromycine et A1408G du gène *rrs* codant l'ARNr16S pour l'amikacine.

***M.leprae* (69 tests génomiques)**

Aucun cas de résistance aux antilépreux parmi les 23 cas de lèpre bactériologiquement confirmés recensés en France en 2016. **Résultats cumulés 2001-2016** sur 181 cas confirmés dont 175 avec détection de la résistance : 6% résistance 1aire (sur 154 nouveaux cas), 26 % résistance 2aire (sur 31 rechutes), essentiellement aux sulfamides, plus rarement à la rifampicine ou aux fluoroquinolones. Les 3 cas de résistance à la rifampicine étaient 2aires et les 2 cas de résistance aux quinolones étaient 1aires.

6. Surveillance de la résistance aux antituberculeux à travers les réseaux partenaires

6.1. Surveillance de la résistance 1aire et 2aire à travers le réseau Azay-mycobactérie (CHU)

- **1.516 cas de tuberculose à culture positive** diagnostiqués en 2015 par **38 CHU** (recueil mené en 2016)
- **caractéristiques principales des cas : 7,8 % antécédents de traitement ; 6,7 % VIH+ ; 66 % nés à l'étranger.**
- **proportion basse et stable des patients avec antécédents de traitement depuis 1996**, en faveur d'une **prise en charge convenable** de la tuberculose en France (indicateur de qualité),
- **proportion basse et stable de patients VIH+** depuis 1996 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,
- **proportion de nés à l'étranger en augmentation** : 35% dans les années 1990, ~50% en 2002 et > 60% depuis 2011. La plupart des pays d'Europe de l'Ouest constatent cette évolution (cf rapports OMS),
- **taux de résistance « 1aire »** (pas d'antécédent de traitement) en 2014 : 14,1 % à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne, **8,8 % à l'isoniazide, 2,8 % à la rifampicine,**
- **taux de résistance « 1aire » à l'isoniazide : augmentation régulière significative** (3,7 % en 1995, 8% en 2014-15) ce qui confirme l'importance de **maintenir en France les recommandations de quadrithérapie pour les nouveaux cas** (c.a.d. avec éthambutol),
- le taux de **multirésistance 1aire** était en 2015 de 2,8%, **soit près du triple** de celui de 2009 et 2010 (1%),
- **le taux de résistance « 1aire »** (nouveaux cas) **différait, comme toujours, selon le pays de naissance** : 9 % chez les patients nés en France mais 16 % chez ceux nés à l'étranger ($p < 0,02$),
- **le taux de résistance « 2aire »** (patients avec antécédents de traitement) **en augmentation depuis 20 ans : 25,4% à l'isoniazide** (16,7 % en 1995), **18,4 % à la rifampicine** (7,9% en 1995). En 2016, 32,5% de résistance 2aire à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne (3,5 fois le taux vu plus haut pour les nouveaux cas),
- **l'augmentation importante des taux de résistance « 2aire »** était associée à un triplement du nombre de cas de tuberculose MDR (7% en 1995, 18,4% en 2015) chez les patients ayant déjà reçu un traitement,
- **le taux de résistance « 2aire » différait, comme toujours, selon le pays de naissance : les 35 cas de multirésistance** diagnostiqués dans les CHU concernaient presque tous des patients nés à l'étranger,
- le **taux global de multirésistance** était en 2015 de **3,7 % dans les CHU**,
- la quasi-totalité des cas **résistants à la rifampicine** étaient aussi résistants à l'isoniazide ce qui en fait un **bon marqueur de multirésistance**.

6.2. Surveillance à visée exhaustive de la tuberculose à bacilles multirésistants (MDR) à travers le réseau CNR-MyRMA

- **4.276 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2015** à travers les **laboratoires** du réseau (recueil mené en 2016), dont **plus de la moitié concentrés dans une vingtaine de laboratoires** (essentiellement des CHU, 2 gros CHG, 2 gros laboratoires privés et 1 laboratoire de sanatorium Ile de France),
- **95 cas MDR en 2016, soit 2,2 %** (IC95 : 1,8-2,7%) du total des cas,
- % de cas MDR (2,6%) calculé sur les 4.276 cas diagnostiqués par les laboratoires qui pratiquent la



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) inférieur à celui calculé sur les 1.516 cas diagnostiqués par les laboratoires de CHU du réseau Azay-Mycobactéries (3,7%), en raison du caractère spécialisé des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU. Ceci montre l'intérêt de **travailler avec deux réseaux complémentaires**,

- le % de cas MDR a quadruplé depuis le début de la surveillance en 1992 : **0,4-0,7% en 1993-1998** ; 0,9% en 1999-2001 ; 1,1-1,4 % en 2002-2010 ; 1,7% en 2011 ; 2,3% en 2012 ; 2,6% en 2014 et 2,2% en 2015,
- le nombre de cas **MDR a clairement augmenté dans plusieurs régions** (Rhône Alpes, Provence-Côte d'azur et Nord-Pas de Calais),
- **l'Île-de-France cumule la moitié des cas MDR**,
- **caractéristiques des cas MDR** : 71% d'hommes, 77% nés à l'étranger (dont 1/2 en Europe de l'Est, 18% en Afrique sub-saharienne, 6% au Maghreb, 12% en Asie), âge médian 32 ans, 15% VIH+, 85 % forme pulmonaire, 56% sans antécédents de traitement (MDR « 1aire »),
- **les caractéristiques des cas MDR se sont beaucoup modifiées** durant les 5 tranches de 5 ans (1992-96 à 2007-11) de la surveillance en ce qui concerne les **antécédents de traitement** (diminution de 73% à 35%), et les **patients nés à l'étranger** (augmentation de 51% à 86%), essentiellement en Europe de l'est et ex-URSS.

7. Surveillance de formes particulières de tuberculose

- **Tuberculose à *M.bovis*** (à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des CHU) : ces cas représentaient **1,7% des 1131 cas de tuberculose humaine** diagnostiqués en 2015 et pour lesquels l'espèce a été identifiée au sein du complexe tuberculosis, ce qui permet **d'extrapoler à une cinquantaine le nombre de cas à *M.bovis* en France**.
- **3 cas de méningite tuberculeuse chez les enfants de ≤ 5 ans** (indicateurs pour juger de l'impact de la politique de vaccination par le BCG), **à travers le réseau CNR-MyRMA : légère augmentation du nombre de cas ces dernières années** (0 à 2 cas/an avant 2011 mais 3 à 4 cas/an de 2012 à 2015).

8. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux de la tuberculose en 2015

- Les données du réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance 1aire/2aire ont été envoyées à l'ECDC et à l'OMS.
- Les données de génotypage (méthode MIURU et séquençage génome entier) des souches MDR ont été envoyées à l'ECDC pour la surveillance des clusters « transfrontaliers » par le réseau ERLN-TB des CNR européens.

9. Surveillance de la lèpre en France

- **23 cas de lèpre ont été bactériologiquement confirmés en 2016** par le CNR-MyRMA sur le territoire français : 11 à Mayotte, 3 en Nouvelle Calédonie et 9 en métropole chez des migrants de régions où la lèpre est encore présente.
- **Analyse rétrospective des 181 cas de lèpre diagnostiqués au CNR-MyRMA entre 2001 et 2016** : 73 en France métropolitaine (55 nés en Afrique, 9 en Asie, 3 en Amérique, 6 en France métropolitaine mai ayant vécu en pays d'endémie) et 108 dans les DOM-TOM. Les taux de résistance sont cités plus haut (§ 5).

10. Etude génotypique des souches de *M. tuberculosis* pour l'investigation de cas groupés

10.1. Tuberculose non MDR

- le génotypage a permis de **confirmer une relation entre les cas dans 22 des 30 situations non MDR soumises à enquête (total 54 cas)** qui comportaient chacune de **2 à 5 cas reliés : 12 fois dans un contexte amical, voisinage, lieu de travail, 4 fois au sein de familles, 1 fois au sein d'une entreprise, 1 fois au sein d'une école, 1 fois dans une prison, 2 fois dans des structures collectives, 1 fois en milieu de soin**.
- les clades (lignées, phylums) dominants étaient : « nt » (n=6), Haarlem (n=4), LAM (n=4), Beijing (n=2), Uganda (n=2).



10.2. Tuberculose MDR

L'étude systématique de toutes les souches MDR reçues en 2015 a permis de montrer :

- la **proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing a augmenté** de 19 à 44 % entre 2006 et 2016, en relation avec l'augmentation de la part des cas MDR chez des patients nés en ex-URSS,
- l'existence de **29 clusters génotypiques de souches (codes MIRU 24 loci identiques) pour un total de 40 des 70 souches MDR-XDR étudiées (58%)**. La technique **MIRU24 n'étant pas très discriminante au sein de la lignée Beijing**, le regroupement de souches en clusters doit être analysé avec prudence avant de conclure à un lien bactériologique, et encore plus à un lien épidémiologique. Chaque cluster a donc été analysé **en tenant compte de marqueurs supplémentaires : 4 loci MIRU « hypervariable complémentaires » et phénotypes/génotypes de résistance**,
- l'**analyse détaillée des 29 clusters** a permis de **confirmer un lien bactériologique et épidémiologique pour 13 d'entre eux** : 3 de lignée LAM, 5 Beijing, 1 X, 1 Haarlem, 1 Ghana, 1 Cameroon, 1 Uganda.
- le **cadre de survenue des 13 clusters** était familial, voisinage, amical, travail et 1 cas à l'hôpital (plusieurs encore en cours d'enquête),
- le nombre de **cas de transmission de souches MDR en France** est **passé de 1 ou 2** pour la période 2006-2009 à **4** en 2010-2012, **7** en 2013 et **9-13** en 2014-2016.

11. Alertes

Le CNR-MyRMA a été mis à contribution par les autorités sanitaires (ARS, InVS, DGS) pour :

- **22 épisodes de cas de tuberculose** pour lesquels des liens bactériologiques et épidémiologiques avaient été démontrés par génotypage et enquêtes de terrain (cf ci-dessus), ont fait l'objet de **nombreux échanges téléphoniques et courriers**,
- l'**alerte européenne lancée par l'ECDC en avril 2015 concernant les infections post-circulation extracorporelle à *M. chimaera* : 2 cas confirmés en France pour la période 2010-15** à travers les enquêtes menées conjointement avec l'InVS. Les souches étaient non distinguables par génotypage.

12. Information et formation, organisation de contrôle de qualité externe pour les laboratoires

- le **site internet <http://cnrmyctb.free.fr>** a été régulièrement mis à jour pour : (a) fiche d'information pour demande d'expertise, (b) fiches des enquêtes annuelles, (c) résultats annuels de la surveillance résistance, (d) publications du CNR-MyRMA, (e) rapports d'activité du CNR-MyRMA, (f) diapositives des formations organisées par le CNR-MyRMA.
- en 2016 accueil de **9 stagiaires** pour une durée totale de **16 mois, soit une moyenne de 1,3 stagiaires présents tout au long de l'année**.
- en 2016 nous avons mené **12 missions** : 5 dans le cadre de l'ESCMID, 4 dans le cadre de l'OMS et 3 dans des cadres d'ONG.

13. Conseils thérapeutiques pour la prise en charge des infections à mycobactéries

- **121 patients MDR ou XDR** ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge lors de **11 réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP, ou TB-consilium)** (total 160 revues de dossiers car chaque patient est discuté plusieurs fois tout au long du traitement, pour modifications et adaptations). Les participants aux RCP étaient (a) l'équipe du CNR-MyRMA, (b) des praticiens du Centre Médical de Bligny, (c) des pédiatres (hôpital Trousseau), (d) un pneumologue (Pitié-Salpêtrière), (e) un membre du SAMU social de Paris, (f) un infectiologue (Pitié-Salpêtrière) et un spécialiste des dosages d'antibiotiques (hôpital Saint-Joseph).
- l'activité de RCP, qui avait déjà augmenté de 50% de 2009 à 2011 (n=46 à 70 dossiers), puis doublée entre 2011



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

et 2012 (n=148), a encore augmenté (n= 160) en 2015-16.

- de nombreux avis (traitement de tuberculose MDR ou de mycobactérioses, problèmes diagnostiques...) ont été donnés hors RCP lors de plus de 1000 appels téléphoniques ou e-mails avec les membres du CNR, correspondant à 1 mois d'équivalent temps-plein.
- au total, que ce soit au travers des réunions plénières des RCP ou de contacts téléphoniques directs, les **4/5 des cas de tuberculose MDR-XDR identifiés en 2016 ont fait l'objet de conseils thérapeutiques par la CNR-MyRMA.**

14. Conseils auprès des autorités sanitaires et scientifiques en 2016

Nationales

- **MSA** (Mutuelle de Santé Agricole) pour la tuberculose bovine.
- **ANSM et InVS** : surveillance des cas d'endocardites à mycobactéries non tuberculeuses et suivi de l'épidémie européenne à *M.chimaera*.
- **INSERM - AVIESAN** : participation au pilotage de « l'Action Tuberculose » de l'institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M) : élaboration des programmes des réunions scientifiques, organisation de 2 symposia (recherche sur les antituberculeux et séquençage WGS dans la tuberculose) (avril et juin, INSERM, Paris).

Internationales

- **ERLN-TB** : les 2 laboratoires participent au réseau des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne, pour l'élaboration du programme « tuberculose » de l'**ECDC**.
- **EUCAST** (European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) et **EMA** (European Agency for Medicine) et **ESGMYC** (ESCMID study group for mycobacterial infections) : élaboration de la méthodologie d'étude des nouveaux antituberculeux.
- consortium des 4 sociétés internationales impliquées dans les infections à mycobactéries (**ATS, ERS, ESCMID, IDSA**) : élaboration des recommandations pour le traitement des infections respiratoires à mycobactéries non tuberculeuses.
- **OMS** « Réseau OMS de surveillance de la résistance aux antituberculeux » et au « Technical Advisory Group » : élaboration du programme de lutte mondiale contre la lèpre.
- **ESCMID** : pilotage du « European Study Group for Mycobacteria (ESGMYC) », organisation d'un « ESCMID postgraduate education course » sur le thème « Difficult to treat mycobacterial infections » en septembre 2016 en partenariat avec la société de microbiologie de Croatie.

15. Travaux de recherche 2016

15.1. Essais in vivo, thérapeutique

Comparaison de l'activité de la lévofloxacine et de la moxifloxacine dans le modèle murin de tuberculose

La lévofloxacine à forte posologie (1000 mg/j) est moins active que la moxifloxacine à forte posologie (800 mg/j) contre des souches de *M. tuberculosis* de bas niveau de résistance aux fluoroquinolones. La moxifloxacine doit donc rester la FQ de choix pour le traitement des TB-XDR. **Publication acceptée fin 2016**

Evaluation du mécanisme d'action de dérivés de fluoroquinolones

Synthèse de nouvelles fluoroquinolones avec l'équipe de G. Anquetin (Faculté des Sciences, Université Paris 5) guidée par les données de relation structure-activité obtenues à travers nos travaux : brevet européen (n°EP 14 173 040.8) 2014, brevet international (n° PCT/EP2015/063752) 2015. Grâce à un financement d'un programme de maturation par la SATT Lutech, nous avons pu poursuivre en 2016 l'évaluation de ces composés actifs dans un modèle murin de tuberculose et rechercher le mode d'action de ces composés, qui ne semble pas lié à l'inhibition de l'ADN gyrase bien que ces molécules soient des dérivés de fluoroquinolones. **Pour des raisons de confidentialité,**



les résultats concernant ces molécules ne seront pas publiés pour le moment.

15.2. Mécanismes d'action et de résistance

Mécanismes de résistance acquise aux aminosides/peptide cyclique (APC) dans les souches cliniques multirésistantes de *M. tuberculosis*

Les aminosides, amikacine (AMK) et kanamycine (KAN) et le peptide cyclique capréomycine (CAP), agissent en se liant à l'ARNr 16S et en inhibant la synthèse protéique. Nous avons mesuré la sensibilité aux APC par méthode phénotypique et avons entrepris l'analyse génotypique par séquençages des gènes *rrs*, promoteur-*eis* et *tlyA* de 206 souches cliniques de *M. tuberculosis* MDR reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2014 : 153 sensibles à AMK/KAN/CAP, 23 R-AMK/KAN/CAP, 22 monoR-KAN, 3 R-AMK/KAN, 2 R-CAP/KAN et 3 monoR-CAP. Nous avons montré que la discordance entre les résultats génotypiques et phénotypiques étaient expliqués par (i) des CMI proches de la concentration critique utilisée pour l'antibiogramme phénotypique (15% des souches), (ii) l'hétérorésistance (15% des souches), et (iii) des mécanismes de résistance non encore élucidés (13% des souches). **Ces résultats viennent d'être publiés dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**

Mécanisme de résistance acquise aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* : mutations compensatoires

Nous avons étudié deux souches cliniques MDR portant une mutation dans *gyrA* habituellement impliquée dans la résistance aux FQ (A90E ou D94N) mais qui se sont étonnamment révélées sensibles à FQ (CMI de l'ofloxacine \leq 2 mg / L). Nous avons montré que les mutations T80A et A90G également présentes dans ces souches restauraient la sensibilité aux FQ lorsqu'elles sont associées à une mutation impliquée dans la résistance de haut niveau aux FQ. **Ces résultats viennent d'être publiés dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**

15.3. Etudes génotypiques de *M.tuberculosis*

Etude des souches MDR de *M.tuberculosis* par séquençage du génome entier (WGS)

Suite au programme d'étude des souches de *M.tuberculosis* MDR de la lignée Beijing par séquençage « génome entier » (WGS) initié progressivement en 2014, nous avons en 2016 analysé 74 génomes de souches cliniques MDR de *M.tuberculosis*.

Ceci a permis de montrer l'existence des 2 larges clusters parmi les souches MDR **Beijing**, mais a permis de subdiviser un de ces clusters en plusieurs branches distinctes : (a) **cluster 5 (CL5) de type 100-32** qui forme un groupe homogène mais de génomes suffisamment distincts (7 à 21 SNPs deux à deux) pour exclure une transmission par contact direct entre les patients. Ces souches sont étroitement apparentées à la souche hyper-virulente Beijing W148 originaire de Sibérie, aujourd'hui répandue dans toute la Russie ; (b) **cluster 2 (CL2) de type 94-32** qui forme un groupe moins homogène que le groupe CL5 et peut être subdivisé en 4 sous-groupes reliés à la souche Beijing CCDC5079 initialement décrite en Chine. La longueur des branches entre les 4 groupes est d'environ 60 SNP, ce qui indique que le CL2 (94-32) est plus ancien que le CL5 (100-32).

Cette étude a permis d'établir que **l'observation en France de souches MDR Beijing non distinguables par MIRU-VNTR 24 loci (souches des clusters CL2 et CL5) ne veut pas dire que les cas résultent de contacts directs, les souches se différenciant par de nombreux SNPs sur la base de l'analyse WGS.**

Parmi les 5 souches **Haarlem** analysées, 3 souches isolées de patients appartenant à une chaîne de transmission clairement identifiée en Corse par les données épidémiologiques de terrain avaient des génomes quasiment identiques (0 ou 1 seul SNP de différence).

Ces résultats montrent l'intérêt du séquençage complet des génomes des souches de *M.tuberculosis* MDR en tant qu'outil de typage moléculaire à très haute résolution et nous ont amené à poursuivre l'implantation en routine de l'approche de séquençage génome entier au CNR-MyRMA.

16. Publications et communications en relation directe avec le travail mené au CNR

- 8 publications nationales
- 24 publications internationales
- 2 chapitres d'ouvrage en anglais
- 10 communications nationales
- 4 communications internationales



- 8 conférences internationales sur invitation
- 6 organisation de colloques / congrès
- 3 émissions radio

17. Santé animale et environnement

- Réunion avec les vétérinaires de Maisons Alfort pour mise au point d'un protocole de surveillance des professionnels exposés à la tuberculose bovine.
- Réunion à l'InVS (Alexandra Mailles, Jean-Paul Guthmann), avec Maria Laura Boschioli (AFFSA) sur la surveillance de la tuberculose à *M.bovis*.
- Nombreuses réunions avec l'InVS et l'ARS suite à l'alerte européenne sur les infections post-circulation extracorporelle (CEC) à *M. chimaera* et au suivi des signalements d'endocardites à mycobactéries non tuberculeuses.
- Mise au point d'un protocole de recherche de *M. chimaera* dans l'eau des appareils «heater/cooler» pour CEC afin de pouvoir l'appliquer dans le cadre de l'alerte européenne d'infections post CEC.



1. Missions et organisation du CNR-MyRMA

Techniques disponibles

1.1. Missions et organisation

Pas de modification des missions depuis l'année précédente (cf. Annexe 1)

Pas de modification des équipes, locaux et équipements depuis l'année précédente (cf. Annexe 1)

1.2. Techniques introduites en 2016

La liste des techniques disponibles depuis les années précédentes sont listées en Annexe 1

1.2.1. Mise en place en routine du séquençage du génome entier (WGS) pour *M.tuberculosis*

L'augmentation du nombre de gènes à séquencer pour la détermination de l'antibiogramme moléculaire des souches MDR reçues au CNR-MyRMA, ainsi que l'analyse MIRU-VNTR réalisée dans le cadre de la phylogénie et de recherche des cas contacts, dont le pouvoir discriminant reste d'ailleurs insuffisant pour certaines lignées (en particulier Beijing, cf supra), justifient de développer de nouvelles stratégies.

Le séquençage du génome (Whole Genome Sequencing, WGS) devrait permettre de mieux comprendre les dynamiques d'émergence d'une partie des cas de tuberculose MDR observés en France, ainsi que les caractéristiques moléculaires des souches qui y sont associées. De nombreuses solutions techniques robustes permettent aujourd'hui de réaliser le séquençage et l'assemblage de génomes complets et l'analyse des résultats, mais à des coûts et délais très variables selon les approches et les plate-formes.

Notre activité en 2016 s'est centrée sur l'**implantation du séquençage et de l'analyse des génomes complets des souches MDR de *M. tuberculosis*** dans un contexte de routine, parallèlement à nos travaux de recherche (cf section 5).

Nous avons tout d'abord poursuivi l'**évaluation des moyens bio-informatiques disponibles pour l'analyse des données issues du séquençage génomique**. L'objectif était de définir les outils les plus adaptés pour (a) explorer, sur la base du nombre de génomes visé (au moins les ~100 souches de TB-MDR annuelles), les variations génomiques, (b) en déduire les SNP (single nucleotide polymorphism) impliqués dans la résistance acquise aux anti-tuberculeux, et (c) en déduire les relations phylogénétiques existant entre les souches analysées.

Nous avons pour cela confronté les résultats d'assemblage obtenus pour un génome de référence (H37Rv) à partir de 2 outils bio-informatiques disponibles sur le web (PolyTB, <http://pathogenseq.lshtm.ac.uk/polytb>, et PhyResSE <https://bioinf.fz-borstel.de/mchips/phyresse/>), à ceux produits par le logiciel BioNumerics de AppliedMaths acquis par le CNR (logiciel permettant de stocker et traiter non seulement les données génomiques mais toutes les autres données liées aux souches séquencées : caractéristiques médicales et épidémiologiques des patients). Cette comparaison montre que la fiabilité des séquences génomiques reconstruites à partir du WGS est meilleure lorsque les données obtenues par BioNumerics et PhyResSE sont combinées dans le but de vérifier individuellement les positions nucléotidiques discordantes.

Nous avons alors **évalué la robustesse des données obtenues par séquençage des génomes complets** de plusieurs souches MDR Beijing à partir de 2 prestataires extérieurs : GATC Biotech (European Genome and Diagnostics Centre, Constance, Allemagne) et GenoScreen (Lille), avec trois assemblages indépendants réalisés par BioNumerics, PhyResSE et GenoScreen. Les jeux de séquences ont été comparés dans le but d'identifier les



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

faux SNPs générés par les logiciels d'assemblage. Cette analyse a permis **d'optimiser le paramétrage des logiciels d'assemblage** dans le but d'éliminer ces faux-SNP.

Afin de vérifier l'efficacité de cette phase d'optimisation, nous avons participé **au contrôle qualité Européen (CQE) « Next Generation Sequencing » organisé par l'ECDC et piloté par le RIVM** (R. Anthony, Tuberculosis Reference Laboratory, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands). Nous avons séquencé les génomes complets de 5 ADN totaux préparés et envoyés par le RIVM aux différents participants du CQE. Tous les SNP (mutations, insertions et délétions) impliqués dans la résistance aux anti-tuberculeux ont été correctement identifiés. L'analyse des 5 génomes a également permis (i) de prédire les clades des 5 souches étudiées (Strain1: Euroamerican (T); strain 2: Haarlem (H2); strain 3: TUR; strain 4: TUR; strain 5: Euroamerican (T)) et (ii) de montrer que les génomes des souche 3 et 4 étaient parfaitement identiques (en accord avec un scénario pré-établi de transmission entre 2 patients ou d'une contamination de laboratoire).

Nous avons enfin enclenché un **programme d'envoi régulier à la société GenoScreen** de suspensions d'ADN préparées à partir des souches de *M. tuberculosis* MDR reçues au CNR pour analyse des génomes complets (4.411.532 paires de bases par génome). **En 2016, 65 génomes ont été déterminés** et analysés pour détection des SNPs, identification des mutations associées à la résistance, spoligotypage sur base de séquençage et comparaison des échantillons par l'analyse phylogénétique comme montré dans le schéma ci-dessous.



Minimum spanning tree obtenu par analyse phylogénétique des 65 génomes complets de *M.tuberculosis* analysés sur la base des SNP et InDels identifiés. Le nombre de SNP et InDels identifiés entre 2 souches reliées sont indiqués sur les branches.

Ces résultats ont été présentés à la 36^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (Paris), et au colloque "Retour d'expérience sur le NGS appliqué aux souches MDR" (Action coordonnée tuberculose (Inserm-IMMI) organisé par W. Sougakoff et E. Cambau.

1. Sougakoff W. Organisation of the meeting Action coordonnée tuberculose (Inserm-IMMI). "Retour d'expérience sur le NGS appliqué aux souches MDR" INSERM, Paris, 2016
2. Sougakoff W., Pang S., Refregier G., Capton E., Brossier F., Aubry A., Veziris N., Robert J., Jarlier V. Apports et limites du séquençage des génomes de *Mycobacterium tuberculosis*. 36^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris, 2016



1.2.2. Nouvelle méthode FluoroType pour la recherche directe de *M.tuberculosis* sur prélèvement

Le nouveau test FluoroType MTB (Hain, Lifescience, Allemagne) est un test semi-automatisé développé pour la détection rapide du complexe *M. tuberculosis* à partir de prélèvements pulmonaires et extra-pulmonaires. Le test est basé sur une amplification PCR en temps réel avec détection spécifique des cibles par une approche sondes HyBeacon sur un thermocycleur FluoroCycler-12 (système fermé qui limite les risques de contamination rencontrés avec l'approche « bandelette »). L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des prélèvements décontaminés sur un automate GenoXtract combiné au kit d'extraction GXT DNA/RNA (Hain). L'évaluation de la performance du test FluoroType MTB au CNR est en cours (le test a été mis en place en octobre 2016).

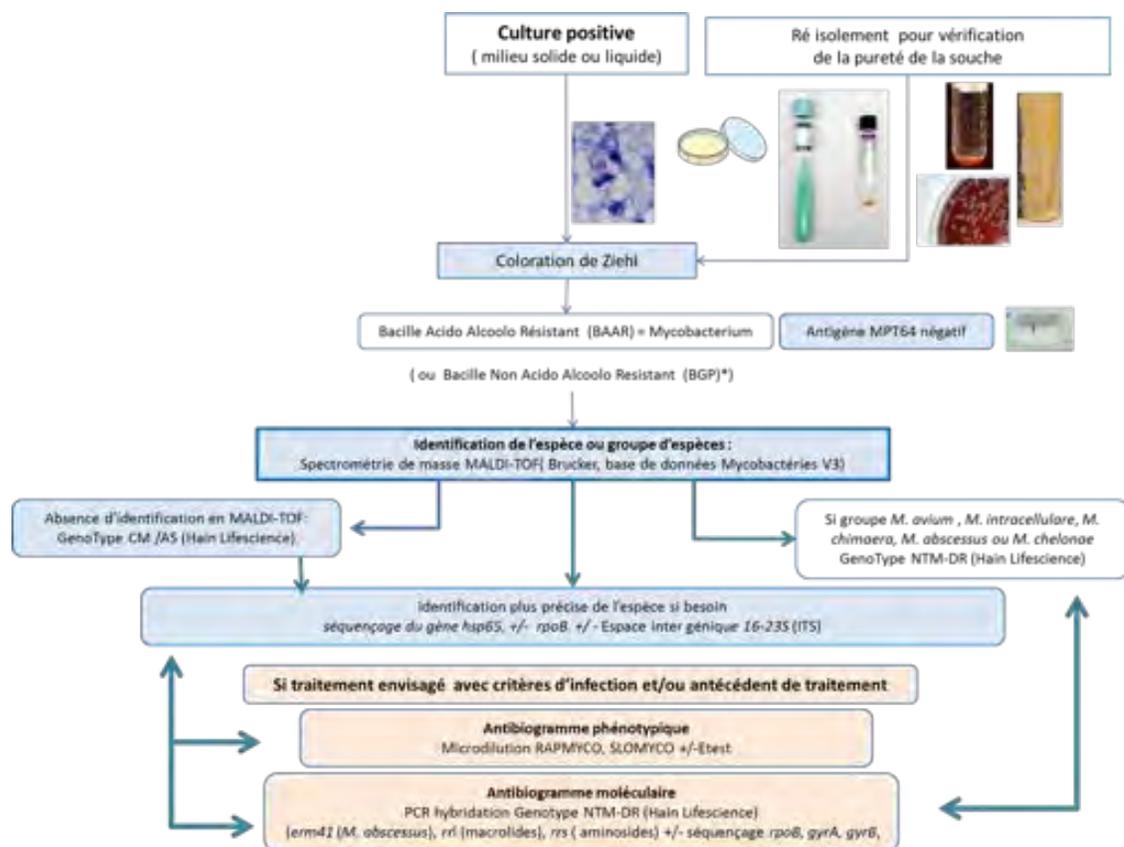
1.2.3. Nouvelle stratégie pour l'identification des mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide

En 2016, nous avons modifié l'algorithme suivi pour l'identification des mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide, grâce à l'implantation en routine de deux techniques évaluées précédemment : l'identification par spectrométrie MALDI-ToF, et le test GenoType NTMDR qui permet non seulement de détecter la résistance acquise des MNT aux macrolides et aux aminosides mais aussi d'identifier les espèces *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. chelonae*, et *M. abscessus*.

La nouvelle stratégie lors de cas d'infections à MNT à croissance rapide est maintenant la suivante

Identification par MALDI-ToF en première étape puis, comme montré dans le schéma ci-dessous) :

- si score satisfaisant et espèces listée ci-dessus et antécédent de traitement antibiotique : test GenoType NTM-DR
- si score insatisfaisant : test GenoType CM et AS puis identification par PCR-séquence du gène *hsp65*, complété de *rpoB* si besoin





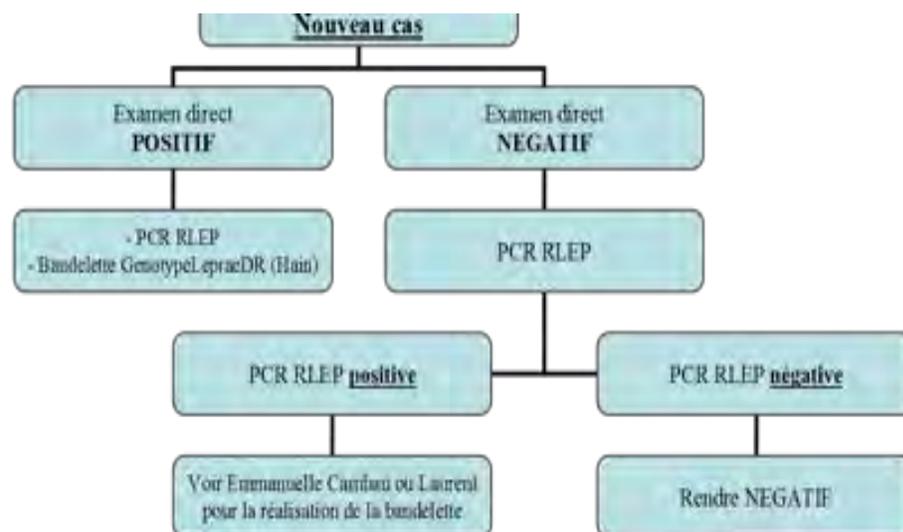
1.2.4. Nouvelle organisation pour le diagnostic bactériologique de la lèpre

Le CNR assure depuis de très nombreuses années le diagnostic de lèpre pour les cas suspects de résistance aux anti-lépreux. Avant 2009, les prélèvements étaient surtout des cas de diagnostiqués dans les DOM-TOM pour lesquels une suspicion de résistance nécessitait une recherche de résistance phénotypique à la rifampicine par inoculation à la souris.

Depuis 2009, nous recevons de nombreuses demandes pour des diagnostics de nouveau cas de lèpre y compris de France métropolitaine et le nombre de cas diagnostiqués a ainsi augmenté (voir chapitre 3). Il nous a donc paru nécessaire de standardiser le diagnostic bactériologique et de le transférer de la partie « recherche universitaire » du CNR à une partie du laboratoire accréditée pour le diagnostic en bactériologie clinique. C'est pourquoi depuis 2016, la recherche de lèpre est faite au laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Lariboisière. Cela nous a conduits à supprimer l'inoculation animale systématique et à réserver le modèle expérimental aux études de recherche sur les nouveaux antibiotiques.

Nous avons validé les techniques de routine : préparation des suspensions à partir des biopsies, examen microscopique avec coloration de Ziehl Neelsen, extraction d'ADN, PCR RLEP, et test GenoType LepraeDR pour la détection de la résistance à la rifampicine, la dapsone et l'ofloxacine.

L'algorithme suivi est maintenant le suivant :



1.2.5. Détermination de la sensibilité phénotypique de la bédaquiline en milieu solide 7H11

La détermination de la sensibilité phénotypique de la bédaquiline par la méthode de référence (méthode des proportions) est réalisée, depuis 2016, en milieu agar Middlebrook 7H11 (milieu préparé et contrôlé par le CNR-MyRMA) aux concentrations de 0,12 et 0,25 mg/L selon les recommandations du fabricant et de l'EUCAST.



2. Activités d'expertise menées en 2015

2.1. Champs des activités d'expertise sur les souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA en 2015

En 2016, le CNR-MyRMA a reçu **1014 souches et prélèvements** pour identification et/ou étude génotypique et phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques et/ou génotypage à visée épidémiologique pour *M.tuberculosis* et mycobactéries non tuberculeuses, et biopsies pour diagnostic de lèpre et tests moléculaires de sensibilité aux antiléproux (Tableau 1).

Les souches et prélèvements proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires hospitaliers, LABM...). **Les prélèvements reçus ne sont pas destinés à des recherche diagnostiques initiales** (le CNR-MyRMA n'a pas d'activité de sous-traitance de mycobactériologie de routine) mais sont utilisés pour **mettre en œuvre rapidement, avant que les cultures soient disponibles**, des tests génotypiques et phénotypiques (identification de l'espèce, recherche de mutations de résistance, antibiogramme direct...) à partir des bacilles contenus dans les prélèvements positifs à l'examen microscopique.

Pour les résultats des expertises, nous ne différencions pas souches et prélèvements, ces derniers n'étant considérés que comme des échantillons « primaires » de souches, disponibles avant culture (sauf pour la lèpre car il n'y a pas de culture pour cette maladie).

En 2016, le CNR-MyRMA a effectué au total **plus de 6600 analyses génotypiques** (gènes étudiés pour identification ou recherche de mutations de résistance) **et tests phénotypiques** (antibiotiques testés) et **158 études génétiques complexes pour comparaisons de souches** (génotypage).

Tendances évolutives 2010-2016

Le nombre total de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA chaque année depuis 2010 est resté globalement stable autour de 1000-1200.

En revanche, il faut noter entre 2010 et 2016 une augmentation des activités d'expertise, liée d'une part à l'évolution des techniques et des connaissances et d'autre part à la complexification des besoins thérapeutiques :

- **doublement** du nombre de souches soumises à étude génotypique de résistance
- **+34%** du nombre de souches de *M.tuberculosis* soumises à un **antibiogramme de 1^{ère} ligne**,
- **+29%** du nombre de souches de *M.tuberculosis* soumises à un **antibiogramme de 2^{ème} ligne**, qui demande beaucoup de travail par l'utilisation de nombreux milieux de culture spécifiques non commercialisés, qui doivent donc être préparés localement puis soumis à des contrôles de qualité,
- **triplément** du nombre de biopsies soumises à la détection de *M.leprae* et du nombre de souches identifiées et analysées génotypiquement.

Tableau 1 : Activités d'expertise du CNR- MyRMA de 2010 à 2015

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Souches soumises à identification^a	794	988	897	900	871	801	752
<i>M. tuberculosis</i>	366	385	430	492	501	417	393
Mycob. atypiques	428	603	467	408	370	384	359
Souches soumises à tests phénotypiques de sensibilité	468	551	542	464	548	508	480
<i>M. tuberculosis</i> ^b	160	170	217	211	236	240	214
	(126)	(139)	(164)	(181)	(212)	(188)	(162)
Mycob. atypiques	308	381	325	253	312	268	266



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Souches soumises à tests génotypiques de sensibilité	223	278	358	325	434	435	468
<i>M. tuberculosis</i>	201	232	284	267	281	285	236
Mycob. atypiques	22	46	74	78	153	150	232
Souches soumises à génotypage épidémiologique ^c	153	119	276*	203	227	194	160
<i>M. tuberculosis</i>	153	119	267*	198	225	174	153
Mycob. atypiques	-	-	9	5	2	20	7
Biopsies lèpre ^d	25 (7)	51 (22)	53 (24)	45 (25)	87 (31)	70 (30)	74 (23)

a : une petite partie des souches reçues (<5%) sont déjà connues ou sont contaminées ou ne sont en fait pas des mycobactéries et n'apparaissent pas dans les autres rubriques du tableau

b : dont (N) souches pour lesquelles il y a eu un **antibiogramme de 1^{re} ligne et un antibiogramme de 2^e ligne**

c : empreintes digitales génomiques (épidémiologie)

d : dont (N) biopsies positives à *M.leprae* et soumises à des tests génotypiques de résistance.

*Rattrapage de l'année 2010. Moyenne sur les 2 années =197

2.2. Identification des souches

752 souches de mycobactéries reçues en 2015 ont été soumises à identification : 393 souches étaient du complexe *M. tuberculosis* et 359 étaient des mycobactéries non tuberculeuses.

2.2.1. Souches de *M. tuberculosis* complexe

Parmi les 393 souches de *M.tuberculosis* complexe reçues en 2016, 194 (49%) ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce, soit lorsque leurs caractères phénotypiques s'écartaient des caractères habituels de l'espèce *M.tuberculosis* (ex. souches donnant des colonies lisses ou dysgoniques...), soit en tirant profit des tests de génotypage qui, pratiqué depuis quelques années par la méthode des MIRU-24 loci, permet aussi de préciser l'espèce (cf. plus loin). Il faut noter qu'en fin d'année 2016, la stratégie du CNR a changé, il a été décidé d'identifier jusqu'à l'espèce toutes les souches du complexe. Cette décision a été prise du fait de la possible augmentation de cas à *M. bovis*.

Parmi ces 194 souches on note :

- **168 *M. tuberculosis* (87%)**, espèce principale responsable de tuberculose humaine,
- **4 *M.bovis* (2%)**. Depuis 2010, ce nombre est compris entre 6 et 13, suggérant qu'il n'y a pas d'augmentation évidente de tuberculose à bacille bovin en France.
- **12 *M.bovis* var *BCG*** (nombre en augmentation par rapport à 2015 mais dans la lignée des années précédentes),
- **9 *M.africanum* (5%)**. Depuis 2010, ce nombre est compris entre 6 et 15.

Tableau 2 : Identification des souches de *M.tuberculosis* complexe reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2016

Espèces	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Identification au sein du complexe * :	157	242	201	277	189	191	194
<i>M. tuberculosis</i>	140	212	164	240	153	169	168
<i>M. bovis</i>	6	12	13	11	11	6	4
<i>M. africanum</i>	6	7	8	15	8	14	9
<i>M. bovis</i> var BCG	5	9	13	11	16	2	12
<i>M. caprae</i>							
<i>M. canettii</i>		1	3				
<i>M. microti</i>		1			1		1
<i>M. tuberculosis</i> complex sans identification au sein du complexe	209	143	229	215	312	226	198
Total <i>M. tuberculosis</i> complexe	366	385	430	492	501	417	393

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



2.2.2. Souches de mycobactéries non tuberculeuses

La répartition des principales espèces parmi les 359 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2016 était la suivante (Tableau 3) :

- **155 souches (43% du total) du complexe *M.avium* (MAC)** dont 69 *M.avium*, 42 *M.intracellulare* et 44 *M.chimaera*. Parmi ces souches, 117 (75%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **36 souches de *M. xenopi*** (10% du total) parmi lesquelles 31 (86%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **66 souches de *M. abscessus*** (18% du total) : 39 *M. abscessus* (appelé aussi *M. abscessus sensu stricto*), 14 *M.abscessus subsp. bolletii*, 13 *M.abscessus subsp massiliense* :
 - 56 étaient issues de prélèvements respiratoires (29 issues de patients atteints de mucoviscidose) dont 53 responsables d'infections.
 - 10 de prélèvements cutanéomuqueux (4), articulaire (2), ganglion (3), os (1), considérés comme des infections sauf le dernier.
- **21 souches de *M. chelonae* complexe** (20 *M. chelonae* et 1 *M. immunogenum*) dont 15 responsables d'infections extra-respiratoires (10 cutanéomuqueuse et 5 d'infections profondes avec une septicémie) et 6 d'infections pulmonaires.
- **14 souches de complexe *M. fortuitum*** (dont 8 *M. fortuitum fortuitum*, 1 souche de *M. peregrinum*, 1 *M. magaritense*, 1 *M. senegalense* et 3 non différenciées dans le complexe) ; 3 avec 2 souches responsables d'infections cutanéomuqueuses communautaires (clou), 4 d'infections post-opératoires, 6 d'infections pulmonaires, et 2 isolées de ganglions dont une contamination.
- **13 souches de *M. kansasii*** (4% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose, toutes responsables d'infections.
- **8 souches de *M. simiae*** dont 7 responsables d'infection.

Une partie des souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2016 (n= 46 soit 13% du total) appartenaient à des espèces rares ou récemment décrites :

- 1 souches du **complexe *terrae*** (espèce à croissance lente) : 1 *M. heraklionense* espèce décrite en 2013, responsable d'infection dans deux cas (1 infection respiratoire).
- 9 souches de *M. lentiflavum* (espèce à croissance lente proche de *M. simiae* et *M. genavense*, décrite en 1996), dont 6 contaminations et 3 infections (1 respiratoire, 1 infection urinaire chez un patient traité pour un cancer de prostate et 1 adénite cervicale chez un enfant de 3 ans).
- 4 souches de *M. malmoense* (espèce à croissance lente) responsables de 2 infections respiratoires, d'une infection de la peau et des tissus mous chez une immunodéprimée et d'une adénite.
- 2 souches de *M. szulgai* (espèce à croissance lente), issues de 2 patients différents, toutes responsables d'infections respiratoires.
- 1 souche de *M. heckeshornense* (espèce à croissance lente proche de *M.xenopi*, décrite en 2000) considérées comme responsable d'infection (respiratoire).
- 1 souche de *M. genavense* (espèce à croissance lente isolée d'une adénite chez un patient séropositif pour le VIH (13 CD4)
- 1 souche de *M. yongonense* (espèce à croissance lente proche de *M. intracellulare*, décrite en 2013) responsables d'infection respiratoire.
- 1 souche de *M. bohemicum* (espèce à croissance lente décrite en 1998) considérée comme un contaminant.
- 2 souches de *M. mucogenicum* (espèce à croissance rapide proche de *M. chelonae*, décrite en 1995) considérées comme des contaminants
- 1 souche de *M. nonchromogenicum* considérée comme un contaminant.
- 1 souche de *M. longobardum* responsable d'une tendinite.
- 1 souche de *M. hassiacum* isolée d'une urine et considérée comme un contaminant.
- 1 souche de *M. neoaurum* (espèce à croissance rapide), isolée d'une poche de cellules souches.
- 1 souche de *M. phocaicum* (espèce à croissance rapide proche de *mucogenicum*) isolée d'une infection osseuse.



Au total, 284 des 359 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2016, soit 79%, étaient responsables d'infections, dont :

- **215 espèces à croissance lente** (essentiellement *M. avium* complex, *M. xenopi*, *M. kansasii*), le plus souvent responsables d'infections respiratoires,
- **104 d'espèces à croissance rapide**, le plus souvent responsables d'infections respiratoires (par exemple dans le cadre de la mucoviscidose pour *M. abscessus*) et d'infections cutanées et des tissus mous (*M. chelonae*, *M. fortuitum* et *M. abscessus*) mais aussi de quelques infections profondes ou disséminées chez des patients immunodéprimés.

Ce pourcentage élevé est en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses activités sur les souches importantes sur le plan médical.

Tendances évolutives 2006-2016

La distribution entre les principales espèces de mycobactéries non tuberculeuses d'intérêt médical (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*) est restée stable entre 2010 et 2016 (**Tableau 3**). L'augmentation du nombre de souches de *M. chimaera* est liée à l'intérêt récent porté à cette espèce qui n'était pas auparavant différenciée de *M. intracellulare*.

Tableau 3 : Principales espèces (importance numérique ou médicale) des souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2015.

Espèce	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<i>M. avium</i>	96 (22%)	116 (19%)	100 (21%)	99 (24%)	93 (25%)	63 (16%)	69 (19%)
<i>M. intracellulare</i>	82 (19%)	103 (17%)	105 (22%)	66 (16%)	71 (19%)	53 (14%)	42 (15%)
<i>M. chimaera</i>				17 (4%)	5 (1%)	29 (8%)	44 (12%)
<i>M. xenopi</i>	52 (12%)	54 (9%)	49 (10%)	48 (12%)	40 (11%)	40 (10%)	36 (10%)
<i>M. chelonae</i>	31 (7%)	44 (7%)	40 (9%)	11 (3%)	17 (4%)	26 (7%)	21 (6%)
<i>M. kansasii</i>	24 (6%)	26 (4%)	17 (3%)	18 (4%)	9 (2%)	13 (3%)	13 (4%)
<i>M. abscessus*</i>	35 (8%)	54 (9%)	44 (9%)	40 (10%)	61 (16%)	43 (11%)	39 (11%)
<i>M. bolletii</i>	10 (2%)	10 (2%)	7 (1%)	7 (2%)	10 (3%)	13 (3%)	14 (4%)
<i>M. massiliense</i>	9 (2%)	18 (3%)	12 (3%)	9 (2%)	2 (1%)	17 (4%)	13 (4%)
<i>M. fortuitum</i>	11 (3%)	25 (4%)	21 (4%)	14 (3%)	12 (3%)	15 (4%)	8 (2%)
<i>M. simiae</i>	7	11	7	6	5	7	8 (2%)
<i>M. gordonae</i>	20	23	16	15	9	5	0
<i>M. peregrinum</i>	6	12	9	3	2	3	1
<i>M. interjectum</i>	0	2		1	1		1
<i>M. mucogenicum</i>	8	11	2	2	5	7	5 (1%)
<i>M. scrofulaceum</i>	4	2		2	1	1	0
<i>M. szulgai</i>	3	8	6	4	6	6	2 (1%)
<i>M. marinum</i>	2	3	4	8	4	5	0
<i>M. arupense</i>	2	5	2	2	1		3 (1%)
<i>M. genavense</i>	3	2	2	1	0	5	1
<i>M. haemophilum</i>	0	0		1	0		1
<i>M. malmoense</i>	2	6	1	7	2	2	4 (1%)
<i>M. ulcerans</i>	1	0			0		
Autres espèces	20 (5%)	56 (9%)	23 (5%)	27 (7%)	14	31	29
Total	428	601	467	408	370	384	359
Infections** : N	308	381	325	341	334	291	284
%	72%	62%	70%	84%	89%	76%	79%



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

**M. abscessus* sensu stricto

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

Dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt en 2007 de l'obligation vaccinale par le BCG, 6 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2016 (3 *M. avium*, 2 *M. intracellulare*, 1 *M. lentiflavum*) ont été isolées d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans. Le nombre de ces cas, qui avait nettement augmenté de 2006 à 2011, a baissé depuis (Tableau 4).

Tableau 4 : Evolution de 2006 à 2016 du nombre de souches de mycobactéries non tuberculeuses issues d'adénites cervicales chez des enfants âgés de moins de 5 ans

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

2.3. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

2.3.1 Tests phénotypiques de sensibilité des souches de *M.tuberculosis* complex

Les tests de sensibilité sur 214 souches de *M.tuberculosis* complex reçues pour cela en 2016 ont été :

- un antibiogramme « standard » (antituberculeux de 1^{ère} ligne) pour 23 souches, pour vérification des résultats trouvés dans les laboratoires d'origine.
- un antibiogramme « complet » (antituberculeux de 1^{ère} ligne et de 2^{ème} ligne) pour 162 souches, dont 71 envoyées pour multirésistance et 91 envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine ou pour suspicion de multirésistance (ex. résistance à l'isoniazide et crainte de résistance associée à la rifampicine) ou parce que les patients présentaient des intolérances médicamenteuses).
- un antibiogramme partiel pour un seul antibiotique pour 29 souches (26 pour le pyrazinamide pour vérification du résultat du laboratoire d'origine, 3 fois pour l'ofloxacine pour dépistage de la sensibilité aux quinolones d'une souche sensible aux antituberculeux de 1^{ère} ligne)

Résistance aux antituberculeux de 1^{ère} ligne des 185 souches reçues en 2016 (Tableau 5)

- 30% (n=55) étaient multisensibles, c.a.d. sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine)
- 70% (n=130) étaient résistantes à au moins un des 4 antibiotiques ci-dessus, dont 35% (n=64) étaient phénotypiquement multirésistantes (MDR) c.a.d. résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine. Ce nombre de souches (64) est inférieur au total des souches MDR reçues dans l'année (71) car 2 souches avaient un génotype MDR mais il n'a pas été possible d'obtenir de phénotype, 4 souches considérées comme MDR par le laboratoire demandeur apparaissaient encore sensibles *in vitro* à la rifampicine malgré la présence de mutations dans le gène *rpoB* (L533P, LI511P, D516Y, H526D) qui entraînent souvent une résistance phénotypique de bas niveau et 1 souche présentait une mutation conférant un bas niveau de résistance à l'isoniazide (KatG A464P). Ces 4 souches,



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

très anormales, ont été considérées comme MDR dans nos rapports statistiques « TB-MDR ».

Entre 2010 et 2016, la proportion de souches multisensibles est restée très basse (~1/3) ce qui reflète la volonté du CNR-MyRMA de se concentrer sur l'étude des souches résistantes et d'éviter de travailler sur des souches sensibles qui peuvent plus facilement être prises en charge par les laboratoires de mycobactériologie de routine, en dehors de situations particulières, par exemple suspicion de résistance finalement non confirmée, intolérance aux antituberculeux de première ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats...

Ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité que l'on peut établir des statistiques représentatives de la sensibilité aux antituberculeux de 1^{ère} ligne en France, mais à partir du travail en réseau spécifiquement organisé pour cela (réseau AZAY-mycobactéries, cf. section « Surveillance »).

Tableau 5 : Phénotypes de résistance aux antituberculeux de première ligne des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2016

		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Sensible*		59 (37%)	51 (30%)	62 (29%)	67 (32%)	59 (25%)	75 (34%)	55 (30%)
Résistant à au moins 1 antibiotique mais non multirésistant	H	13	21	20	19	30	25	33
	S	7	6	7	4	4	2	4
	R	4	5	9	9	11	2	2
	E	0	0	1	0	0	1	0
	H+S	23	22	14	28	22	20	22
	H+E	1	0	0	1	3	0	1
	H+S+E	7	1	1		2	1	4
	R+S			1		0	0	0
	R+E			1		0	0	0
R+S+E	-		-	1	0	2	0	
Sous-total		56 (35%)	55 (33%)	54 (25%)	61 (29%)	72 (31%)	53 (24%)	66 (35%)
Multirésistant	H+R	5	7	22	13	15	12	10
	H+R+S	12	16	21	16	12	16	15
	H+R+E	2	6	7	8	5	18	3
	H+R+S+E	26	35	51	46	73	46	36
Sous-total		45 (28%)	64 (37%)	101 (47%)	83 (39%)	105 (44%)	92 (42%)	64** (35%)
TOTAL GENERAL		160	170	217	211	236	220	185

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

** ce nombre de souches (64) est inférieur au total des souches MDR reçues dans l'année (n=71) car 2 souches avaient un génotype MDR mais il n'a pas été possible d'obtenir de phénotype, 4 souches considérées comme MDR par le laboratoire demandeur apparaissaient encore sensibles *in vitro* à la rifampicine malgré la présence de mutations dans le gène *rpoB* (L533P, L1511P, D516Y, H526D) qui entraînent souvent une résistance phénotypique de bas niveau et 1 souche présentait une mutation conférant un bas niveau de résistance à l'isoniazide (KatG A464P). Ces 4 souches, très anormales, ont été considérées comme MDR dans nos rapports statistiques « TB-MDR » (ex. tableaux 6 et 9).

Résistance aux antituberculeux de 2^{ème} ligne des 162 souches reçues en 2016

- Résultats pour les 71 souches reçues comme multirésistantes (MDR) :

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (Tableau 6) : streptomycine 72%, éthambutol 55%, pyrazinamide 48%, éthionamide 52%, cyclosérine 13%, PAS 10% et, pour les antituberculeux qui entrent dans la définition de l'ultrarésistance (XDR), au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 27%, fluoroquinolones 17%.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Ces chiffres ont peu évolué depuis 2010, à part l'augmentation passagère en 2013-14 des % de résistances aux aminoside de réserve et fluoroquinolones.

La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **aussi** aux fluoroquinolones **et** à au moins un aminoside de réserve (XDR) était de **8%** soit **6 cas de tuberculose XDR identifiées en 2016** (cf. ci-après, Tableau 10).

Tableau 6 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M.tuberculosis* complex reçues comme multirésistantes (MDR) au CNR-MyRMA de 2010 à 2016

	Années (n souches testées)	2010 (45)	2011 (64)	2012 (92)	2013 (83)	2014 (111)	2015 (98)	2016 (71)
a	Ethambutol	66	70	58	66	70	65	55
	Pyrazinamide				40	50	43	48
	Streptomycine	75	80	70	73	81	69	72
b	Amikacine	13	9	13	20	12	14	12*
	Kanamycine	20	23	27	41	31	26	20*
	Capréomycine	12	11	14	23	18	13	14*
c	Fluoroquinolones	23	22	28	30	39	20	17 ^b
d	Ethionamide	75	82	62	73	64	71	52
e	PAS	9	17	17	24	14	5	10
	Cyclosérine	9	18	28	24	19	10	13
	Bédaquiline					3	2	0
	Linezolid	0	0	1	0	1	1	1

a : antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine

b : aminosides autres que streptomycine (entrent dans la définition de XDR) ; c : entre dans la définition de XDR

d : ou prothionamide ; e : antibiotiques de « dernière ligne »

* 7 résistantes aux 3 aminosides

^b parmi ces souches résistantes à 2 mg/l d'ofloxacine (définition OMS de la résistance aux fluoroquinolones), 2 (17%) restaient sensibles à 2 mg/l de moxifloxacine.

- Résultats pour les 91 souches reçues 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. suspicion initiale de multirésistance, effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine...) (tableau 7) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui est bien sûr logique : **0% à l'amikacine** ou **aux fluoroquinolones, 5% à l'éthambutol**.

L'observation d'une faible proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR (5/603, soit 1%, pour la période cumulée 2010-2016) est un résultat rassurant car l'utilisation large de cette famille d'antibiotiques dans la communauté (infections urinaires, respiratoires etc...) fait craindre une émergence plus marquée de la résistance parmi les souches de *M.tuberculosis* complex sensibles aux antituberculeux de 1ère ligne et, à terme, l'impossibilité d'utiliser cette classe pour les traitements antituberculeux de 2ème ligne.

Tableau 7 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2016 pour antibiogramme de 2^e ligne, dans un contexte autre que la multirésistance (suspicion initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1^{re} ligne...)

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

n.b. l'éthionamide peu ou pas utilisé hors multirésistance, n'est plus testé systématiquement sur les souches non MDR



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Le **Tableau 8** montre la **stabilité** du nombre de **souches MDR** reçues de **2001 à 2010** (moyenne 48 cas/an), puis **l'augmentation** en 2011 (69 cas), puis **une stabilisation** entre en 2012 et 2015 **autour d'une centaine de cas annuels** et enfin **une diminution** en 2016 à **71** mais qui reste au-dessus de la période antérieure à 2010.

Le **nombre de souches XDR** qui était de 1 ou 2 par an de 2006 à 2008 (idem depuis 2002) **a augmenté** à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011 17 en 2012, 22 en 2013, 26 en 2014 puis **a diminué** à **10 en 2015 et 5 en 2016**.

Fait important en matière de surveillance, la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA (cf. section 3) et qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro* a augmenté entre les périodes 2001-02 (~ 60 %) et 2010-15 (98-100 %). **Le CNR-MyRMA reçoit donc maintenant la quasi-totalité des souches MDR de France, en cohérence avec les recommandations du HCSP.**

Tableau 8 : Evolution de 2001 à 2016 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA (cf surveillance). Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA

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

* ce nombre sera disponible en 2017 via l'enquête annuelle du réseau CNR-MyRMA (cf chapitre surveillance)

Evolution 2006-2016 de la distribution par pays de naissance des patients porteurs des souches MDR reçues au CNR-MyRMA

- Le **Tableau 9** montre la **distribution des pays de naissance des cas de tuberculose MDR correspondants aux souches reçues de 2006 à 2016**. On voit que les nombres de souches MDR de patients nés dans les pays d'Afrique hors Maghreb, dans les pays d'Asie et dans les pays d'Amérique sont restés stables.

En revanche il faut noter :

- La nette diminution du **nombre de souches MDR de patients nés dans les pays d'ex-URSS et d'Europe de l'Est** amorcée en 2015 (n=37) et qui se poursuit en 2016 (n=20) sans toutefois retrouver les niveaux de la décennie précédente (sur la période 2006 – 2010 : n~10/an). Cette diminution est presque entièrement due à la chute du nombre de cas **MDR de patients nés en Géorgie** (n=3 en 2016 contre 14 cas en 2015 et 40 cas en 2014).
- La **stabilisation du nombre de souches MDR de patients nés en France** (6 à 11/an en 2006-2013, 15 en 2014, 21 en 2015, **17 en 2016**) ; donnée plutôt satisfaisante mais qui mérite d'être surveillée de près.
- Le retour « à la normale » du nombre de souches MDR de patients nés au Maghreb (1 à 5/an en 2006-2014, 8 en 2015 et **5 en 2016**).

Tableau 9 : distribution des pays de naissance des cas de tuberculose MDR correspondants aux souches



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

reçues de 2006 à 2016

Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
France	11	5	6	6	4	8	9	5	15	23	17
Allemagne								1		1	
Norvège				1							
Portugal		2	2		2	1			2	1	
Total Europe Ouest	11	7	8	7	6	9	9	6	17	25	17
Albanie										1	1
Roumanie	2	1	5	1		6	3	3	9	6	3
Pologne										2	
Bulgarie								1		2	1
Macédoine											1
Moldavie	1	1	1		1	1	1				2
Féd. Russie hors Tchécémie	2		1	2	1	7	6	2	4	3	3
Fédération Russie - Tchécémie	1	1	5	3	4	4	8	3	1	6	4
Arménie	1	1	2	3		4	2	1	3	1	
Azerbaïdjan					1						
Géorgie	2	1	1	4	1	5	26	32	40	14	3
Kosovo								1			
Lituanie								2			
Ukraine		2					4	2	4	2	2
Total Europe Est et ex. URSS	9	7	15	13	8	27	50	47	61	37	20
Algérie	1	3	2	1	1	3	1	2	1	1	4
Maroc		1		2		1	2	1	1	6	1
Tunisie						1	1	1		1	
Total Maghreb	1	4	2	3	1	5	4	4	2	8	5
Angola	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Bénin							1	1			
Cameroun		2	2		2			2	1		1
Cap-Vert					1					1	
Congo	3	1	4	4	1		3		3	2	2
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	2	1	1	2	3	4
Djibouti	1										1
Egypte							1		1		
Erythrée								1			
Ethiopie	1			1						1	
Ghana				1							
Guinée Conakry	3	1	2		2	1	1	2	1	1	1
Madagascar-Comores		1		1				1			
Mali				1					1	1	
Mauritanie				1		1					
Mozambique											1
Niger			1								
Nigeria										1	1
Rep. Centrafricaine	1	1				1	2	1	2	2	
RD Congo	4	5	1		2	5	5	4	6	1	1
Rwanda						1					
Sénégal	1		2	1	1		3	1	2	2	1
Somalie											2
Soudan				1			1				1
Tchad					1	1	1				
Togo	1							1			
Total Afrique hors Maghreb	21	13	15	15	14	13	19	16	20	17	17
Bangladesh							1		1		1
Cambodge			1								
Chine	1	1	1	2	1	1	3	1	1	5	2
Corée				2							
Inde	2			2		1	2				1
Indonésie									1		
Irak									1		
Mongolie					2	1	1				1
Népal	1							1			
Pakistan			1	1	1	2	2	1		1	
Sri Lanka		1							1		
Syrie				1						1	
Thaïlande						1			1	1	
Tibet		1			3			1		1	3
Turquie								1			
Vietnam			1	2	2	1		2	3		1
Total Asie	4	3	4	10	9	7	9	7	9	9	9
Chili				1							



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Colombie										1	1
Brésil										1	
Haïti					1	1	1				
Equateur								1	1		
Pérou	1	1			1			1		1	1
Total Amériques	1	1	0	1	2	3	1	2	1	3	2
Non précisé								1	1		1
GRAND TOTAL	48	35	44	49	40	64	92	83	111	98	71

La Figure 1 montre l'évolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2016. En 2016, cette distribution est assez homogène et est proche de celle de la décennie précédente. En effet, les cas MDR de 2016 sont principalement dus aux patients nés en France, en ex-URSS et en Afrique (hors Maghreb).

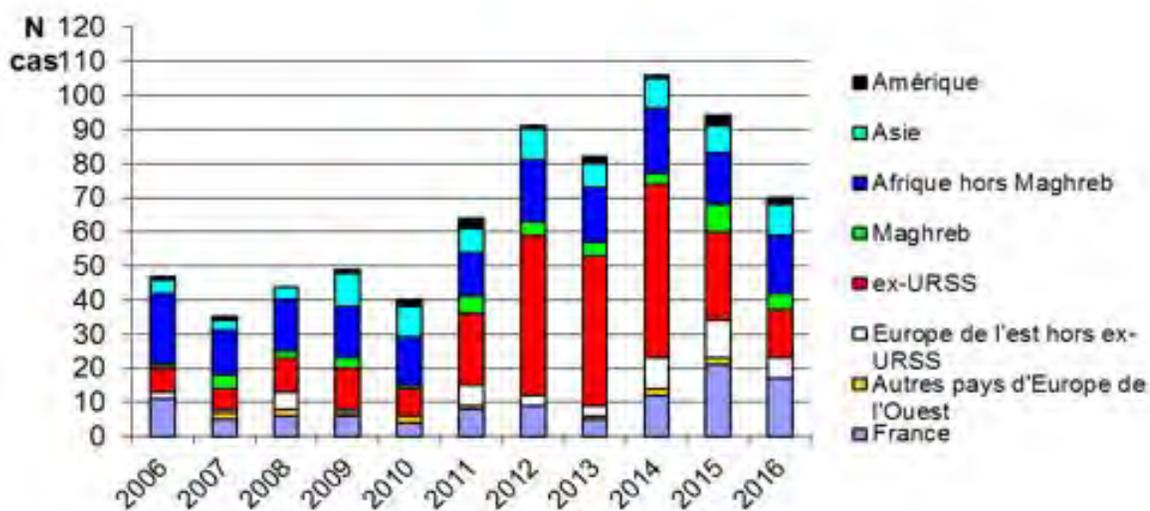


Figure 1 : évolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2016

Evolution de la proportion de souches XDR parmi les souches MDR et de la distribution par pays de naissance des patients porteurs des souches XDR reçues au CNR-MyRMA

La Figure 2 (cf aussi le tableau 8) montre l'augmentation de la proportion des souches XDR parmi les souches MDR de 2001 à 2014 : 2-3% (2002 – 2005), 4-5% (2006-07), 8% (2009), 13% (2010), puis environ 20% de 2012 à 2014. Cette proportion est à la baisse depuis 2015 (10%) et la tendance se confirme en 2016 (8%) pour retrouver son niveau de 2009.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

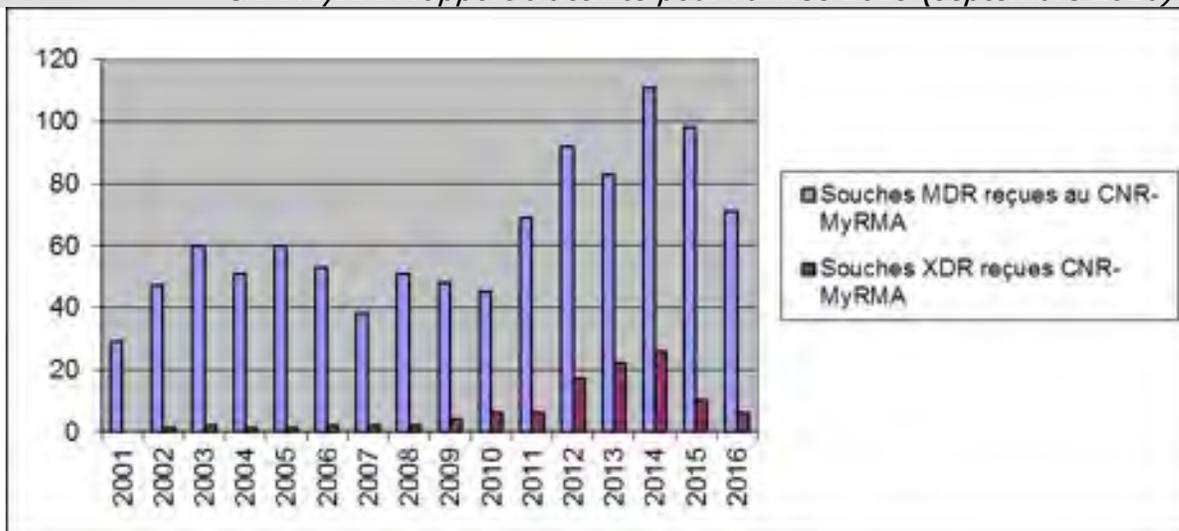


Figure 2 : évolution de la distribution des cas MDR et XDR de 2001 à 2016

Le **Tableau 10** montre la nette diminution du nombre de cas XDR depuis le pic de 2014 (n=26) avec seulement 6 cas XDR en 2016.

Les patients d'ex-URSS représentaient 1/3 des cas de tuberculose XDR sur la période 2004-2008, 2/3 des cas entre 2009 et 2011, et la quasi-totalité des cas depuis 2012. **En 2016, cette tendance évolue avec une distribution équivalente du nombre cas XDR nés en France (n=3) et nés dans un pays de l'ex-URSS (n=3)**. Le nombre de cas XDR nés en France sera donc à surveiller pour les années à venir.

Entre 2012 et 2015, les patients géorgiens représentaient la grande majorité des cas XDR alors **qu'en 2016, 1 seul cas XDR sur les 6 est né en Georgie, ce qui met en évidence la nette diminution des cas XDR de patients géorgiens**.

Tableau 10 : Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyRMA de 2004 à 2016

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Amérique	Asie	Europe de l'Est et ex-URSS	Total
2004		1 (Algérie)					1
2005			1 (Mali)				1
2006	1 (France)					1 (Tchéchénie)	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 Tchéchénie, 1 Géorgie, 1 Azerbaïdjan)	6
2011	1 (Portugal)	2 (Algérie)	1 (Côte d'Ivoire)			2 (Russie)	6



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

2012			17 (15 Géorgie, 1 Arménie, 1 Ukraine)	17
2013	1 (France)		21 (19 Géorgie, 1 Ukraine, 1 Roumanie)	22
2014	2 (France, Portugal)	1 (RD Congo)	23 (20 Géorgie, 3 Russie)	26
2015	1 (France)		9 (5 Géorgie, 2 Tchétchénie, 1 Russie, 1 Arménie)	10
2016	3 (France)		3 (1 Tchétchénie, 1 Moldavie, 1 Géorgie)	6

Le **tableau 11** montre que la majorité (45%) des souches MDR reçues en 2016 étaient adressées par des laboratoires de la **région Ile de France (n=32)** comme en 2014 et en 2015 (n.b. présentation selon la **nouvelle organisation régionale**). Les deux autres régions les plus concernées par l'envoi de souches MDR en 2016 étaient les régions Provence-Alpes-Côte d'Azur et Nouvelle Aquitaine.

Tableau 11 : Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyRMA depuis 2014 (selon la nouvelle organisation régionale)

Region	N souches reçues en		
	2014	2015	2016
Auvergne, Rhône-Alpes	13	11	5
Bourgogne, Franche-Comté	2	0	1
Bretagne		2	2
Centre-Val-de-Loire	2	1	1
Corse	1	1	
Grand-Est	5	3	4
Guadeloupe			
Guyane			
Hauts-de-France	8	6	4
Île-de-France	58	48	32
La Réunion	2		
Martinique			
Mayotte			
Normandie	6	3	3
Nouvelle-Aquitaine	2	11	6
Occitanie	7	5	2
Pays de la Loire		4	2
Polynésie Française			1
Provence-Alpes-Côte d'Azur	6	3	8
Total	112	98	71



Tendances évolutives 2006-2016

Le nombre moyen de **souches MDR** reçues au CNR-MyRMA, qui était resté à peu près stable jusqu'en 2010 **autour d'une moyenne de 48 par an, a augmenté** en 2011 (n=69) pour atteindre une centaine de cas par an entre 2012 et 2015. **Ce nombre est redescendu à 71 cas en 2016 mais reste toutefois au-dessus de la moyenne de la période avant 2010.**

Le nombre de **souches XDR**, qui était de **1 ou 2 par an de 2006 à 2008** (idem depuis 2002), a **augmenté à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011, 17 en 2012, 22 en 2013 et enfin 26 en 2014. Ce nombre est redescendu à 10 en 2015 puis 6 en 2016.**

La **proportion de souches XDR parmi les souches MDR a donc beaucoup augmenté, de 2-3% pour la période 2002 - 2005, à 4-5% en 2006-07, 8% en 2009, environ 20% de 2012 à 2014. Celle-ci est redescendue à 10% en 2015 puis 8% en 2016.** Ces variations sont principalement en lien avec le nombre de **patients porteurs de souches XDR originaires de l'ex URSS, en particulier la Géorgie** qui, après avoir **fortement augmenté (de 5 en 2010 à 23 en 2014), a diminué en 2015 (n=9) puis en 2016 (n=1).**

Le nombre de **souches « pré-XDR »** (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones **ou** à un des trois aminosides de réserve) a **beaucoup augmenté** : 8 en moyenne par an de 2006 à 2010 mais environ 20 par an depuis 2011 (**n=18 en 2016**).

Le CNR-MyRMA reçoit la totalité des souches MDR de France

Depuis 2013, le CNR-MyRMA envoie chaque trimestre à l'InVS et à la DGS un bilan évolutif des souches MDR-XDR reçues au CNR, incluant les pays de naissance (cf exemple joint en annexe).

2.3.2. Tests phénotypiques de sensibilité des souches de mycobactéries non tuberculeuses, tendances évolutives

Au total 266 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2016 ont fait l'objet de tests de sensibilité aux antibiotiques.

Le CNR-MyRMA concentre ses efforts en matière de tests de sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries non tuberculeuses sur les cas d'infections, en particulier ceux ayant déjà fait l'objet d'un traitement (échecs thérapeutiques et rechutes). En effet, les infections à mycobactéries atypiques n'étant pas contagieuses, il n'y a pas de résistance primaire (c.a.d. résistance chez un patient n'ayant pas reçu de traitement) mais seulement de la résistance secondaire (c.a.d. acquise lors d'un traitement). Ceci a été bien démontré par une publication récente du CNR-MyRMA (Renvoisé *et al.* Antimicrob. Agents Chemother. 2015)

Les résultats pour les **principales espèces**, soit pour 236 des 266 souches testées, sont présentés ci-après.

***M.avium* complex** : parmi les 148 souches reçues en 2016, 95 (42 *M.avium*, 24 *M.intracellulare* et 29 *M.chimaera*) ont fait l'objet d'un antibiogramme (64%) dont 11 (7%) étaient intermédiaires ou résistantes à la clarithromycine (CMI > 64 mg/l en milieu 7H9 pour 9 souches et de 16 mg/l pour 2 souches). Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement (n=70), 11 avaient une souche résistante soit **16% de résistance secondaire** (aucun cas de résistance primaire).

M.xenopi : parmi les 36 souches reçues en 2016, 25 ont fait l'objet d'un antibiogramme. Aucune n'était résistante à la clarithromycine. Seuls 3 patients avaient des antécédents de traitement. **Aucune des 158 souches de *M.xenopi* reçues entre 2012 et 2016 n'a été trouvée résistante à la clarithromycine.** Il faut signaler qu'en 2016 une souche de ***M.xenopi*** résistante à la rifampicine et à l'éthambutol a été isolée chez un patient en cours de traitement pour une infection à *M. avium*.



M.kansasii : Parmi les 13 souches reçues en 2016, 7 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine. **Aucune des 42 souches de *M.kansasii* reçues entre 2012 et 2016 n'a été trouvée résistante à la rifampicine** y compris pour les 5 patients ayant des antécédents de traitement.

Espèces à croissance rapide : 109 souches ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques. Pour ces espèces, un antibiogramme phénotypique est réalisé par la méthode de microdilution. De plus, pour *M.abscessus*, l'étude du gène *erm(41)*, beaucoup plus fiable que les tests phénotypiques, est utilisée pour déterminer le profil de résistance naturelle à la clarithromycine (Bastian et al. 2011). En effet, la présence de ce gène confère une résistance naturelle, dont le sequevar C/T28 détermine le caractère inductible ou constitutif.

Principaux résultats :

- les 8 souches de *M. fortuitum* étaient comme attendu résistantes à la clarithromycine (présence naturelle d'un gène *erm* conférant une résistance inductible aux macrolides chez cette espèce) mais sensibles à la ciprofloxacine. Les autres souches du complexe ne sont pas connues pour leur phénotype de résistance naturelle ou acquise
- 2 des 21 souches de *M.chelonae* étaient résistantes à la clarithromycine (même patient, infection cutanée, sous corticothérapie au long cours)
- parmi les 65 souches de *M.abscessus*, **la proportion de celles résistantes à la clarithromycine** pour chaque sous-espèce était : 31/38 pour *M.abscessus sensu stricto* (dont 31 avait un sequevar T28 du gène *erm41* conférant une résistance inductible naturelle aux macrolides, et 0/7 souches avec une résistance acquise parmi le 8 souches avec un sequevar C28 naturellement sensible), 2/13 pour *M.abscessus subsp massiliense* (gène *erm(41)* naturellement inactif chez cette espèce naturellement sensible), 14/14 pour *M.abscessus subsp bollettii* (gène *erm(41)* naturellement actif conférant une résistance inductible chez cette espèce).
- Par ailleurs 5 souches étaient résistantes aux aminosides (2 *M. bollettii*, 1 *M. abscessus* T28, 1 *M.massiliense*), isolées de prélèvements respiratoires.

Les 30 souches des espèces rares ont été testées pour accumuler des données sur les profils de sensibilité naturelle aux antibiotiques. Les résultats ne sont pas présentés ici.

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

491 souches reçues en 2016 ont été soumises à des tests de détection moléculaire rapide de mutations impliquées dans la résistance :

- **236 souches de *M.tuberculosis*** pour la rifampicine et/ou 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.

Un total de 1244 recherches génotypiques de résistance totalisant 1735 tests a été effectué pour cela.

- **232 souches de mycobactéries non tuberculeuses** pour la clarithromycine et les aminosides.
- **23 souches de *M.leprae*** pour la rifampicine, les quinolones et la dapsonne.

En 2016, le CNR CNR-MyRMA était en mesure d'analyser 19 gènes impliqués dans la résistance acquise permettant d'étudier la sensibilité à **14 antibiotiques** (rifampicine, fluoroquinolones, pyrazinamide, isoniazide, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine, streptomycine, bédaquiline, linézolide, macrolides, sulfamides) : *rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *gyrB*, *pncA*, *rrs* (*rrs500*, *rrs900*, *rrs1400*), *eis*, *tlyA*, *embB*, région entre *embC* et *embA*, *ethA*, *ethR*, *atpE*, *Rv0678*, *rrl*, *rplC*, *erm(41)*, *folP*.



2.4.1. Mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis* complex, tendances évolutives 2006-2016

Durant la période 2010-2016, le nombre de recherches de mutations a augmenté de 50% (Tableau 2).

Tableau 12 : nombre de recherches génotypiques de résistance aux antituberculeux (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide, fluoroquinolones, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine) sur les souches de *M.tuberculosis* complex reçues de 2010 à 2016. Le nombre total de gènes analysés en 2015 et 2016 est précisé entre ().

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Rifampicine : <i>rpoB</i>	201	232	284	267	281	285 (285)	231 (231)
Isoniazide : <i>katG + inha</i>	198	227	280	263	284	285 (570)	236 (472)
Pyrazinamide : <i>pncA</i>	137	183	217	211	225	210 (210)	179 (179)
Fluoroquinolones : <i>gyrA + gyrB</i>	128	183	231	215	232	238 (476)	185 (370)
Ethionamide : <i>ethA + ethR</i>	50	79	103	93	119	106 (212)	70 (140)
Aminosides : <i>rrs</i>	56	99	159	121	156	156 (156)	172 (172)
Ethambutol : <i>emB</i>	62	105	159	121	155	222 (222)	171 (171)
Total	832	1109	1433	1291	1452	1502 (2131)	1244 (1735)

* Dont 12 *gyrB*

Rifampicine (RIF)

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBDR*plus*® complété par l'amplification et le séquençage du gène *rpoB* ont permis d'identifier des mutations dans *rpoB* pour 71 des 231 (31%) tests réalisés en 2016 (Tableau 13).

La distribution des mutations était comme suit :

- 43 mutations S531L (61% des mutations)

- 28 autres mutations (39% des mutations) réparties entre les codons 505 et 533 (tableau 13).

La part dominante de la mutation S531L du gène *rpoB* dans la résistance à la rifampicine reste de l'ordre de 2/3 depuis 2010, en accord avec les données publiées à l'étranger. En 2016, toutes les souches phénotypiquement résistantes à la rifampicine avaient une mutation du gène *rpoB*, ce qui confirme que la recherche de mutations dans ce gène est une excellente approche rapide de détection de la résistance à la rifampicine et même de la multirésistance en raison de la rareté des souches monorésistantes à la rifampicine (cf. § surveillance de la résistance).

Tableau 13 : Distribution des mutations du gène *rpoB* identifiées dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2010 à 2016 pour détection moléculaire de la résistance à la rifampicine (techniques : GenoType®MTBDR*plus*, séquençage *rpoB*)

Mutations	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
S531L	37	58	76	66	78	74	43
H526Y	4	6	3	1	3	5	5
H526D	4	6	6		6	3	5
H526N ou T ou L ou S ou R ou C ou P	2	4	7	7	6	5	
D516V	1	1	2	2	8	2	4
D516Y		3	2	4	4	2	3
D516G							1
Délétion N519		2					
L511P	2			3		2	1
Q513P		1	2		1		
Q513K			1				1
Q513E			1	1			



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

L521V			1		1		
S522Q					1	1	
H526N							1
S531W		2	1	1	3		1
S531F		1	1	4	4	1	1
L533P	3	2	1	2	9	10	2
F505L + D516Y				1		1	
S509T + S522W		1					
S509T + D516Y		1				1	
Q510H + H526R		1					
L511P + D516G		1	3	1			
L511P + M515V			1				
L511P + H526N				1			
L511R + D516Y		3					
L511P + 1546-1547insT(516)			1				
S512I + H526N			1				
M515I + D516Y						1	
D516G + L533P				1			
D516E + H526N						1	1
H526Q + L533P						1	
H526N + G534A							1
Délétion		1	1		1	1	
Insertion					1	1	1
Mutation entre 516 et 522			3				
Total avec mutation	54	94	114	95	126	112	71
Pas de mutation	147	138	161	162	151	165	153
PCR négatives + ininterprétables ^a			9	10	4	8	7
Total général	201	232	284	267	281	285	231

^a nouvelle rubrique à partir de 2012

Isoniazide (INH)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBDR*plus*, complété par le séquençage des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur d'*inhA*, a permis d'identifier des **mutations dans *katG* ou *inhA* pour 131 des 236 (56%) souches testées en 2016 (Tableau 14)** :

- **96 fois (73%) une mutation S315T de *katG***, corrélée à une résistance phénotypique à haut niveau à INH, dont 83 mutations isolées et 13 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA*,
- 12 fois (9%) une mutation dans *katG* à une position autre que 315,
- 32 fois (**24%**) une mutation dans la **région régulatrice du gène *inhA*** corrélée, lorsqu'elle est isolée (n=19, 15%), à une résistance phénotypique à bas niveau à INH. **La mutation de type « -15 c>t » était la plus fréquente (n=26, 20%).**

Tendances évolutives 2010-2016 : on note la part dominante de la mutation isolée S315T dans le gène *katG*, qui représente environ **75% des cas** (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 20% des cas.**

On note à partir de 2014 une augmentation significative du nombre de souches avec une double mutation KatG S315T et promoteur inhA (n=21 en 2014, n=18 en 2015, n=13 en 2016, contre n=6 en 2013).

Les souches résistantes à l'isoniazide pour lesquelles il n'a pas été détecté de mutation ni dans *katG-315* ni dans *inhA* et sa région régulatrice représentent 3 à 9 % de l'ensemble des souches testées selon les années. **Les 2 gènes étudiés permettent donc de détecter génotypiquement 91 à 97% des souches phénotypiquement résistantes.**



Tableau 14 : Distribution des mutations des gènes *katG* et *inhA* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2010 à 2016 pour détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide (techniques : GenoType®MTBDRplus, séquençage *katG*, *inhA*, promoteur *inhA*)

Mutations	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
KatG S315T	49	76	101	106	102	91	83
KatG 315 autre que S>T	-	3	1	1	1		
KatG autre que S315	7	12	10	7	5	5	12
Promoteur <i>inhA</i>	24	21	13	22	21	31	19
dont -15	24	20	13	22	21	26	18
Partie codante de <i>InhA</i>	1	2		4	1	4	3
Partie codante de <i>InhA</i> et promoteur <i>inhA</i>	1						
KatG S315T et promoteur <i>inhA</i>	8	10	9	6	21	18	13
Autre combinaison KatG et <i>InhA</i>					1		1
Total avec mutation(s)	89	124	132	146	152	149	131
Pas de mutation	109	103	140	112	119	127	99
PCR négatives + ininterprétable ^a			8	5	13	9	6
Total général	198	227	280	263	284	285	236

^a nouvelle rubrique à partir de 2012

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 179 souches en 2016** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).

Parmi les 179 souches, 43 (24%) avaient une mutation du gène *pncA* (**Tableau 15**) dont 2 *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 de nombreuses années car un tel tableau serait trop long.

Tableau 15 : Distribution des mutations du gène *pncA* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA entre 2012 et 2016 pour détection moléculaire de la résistance au pyrazinamide (technique : séquençage *pncA*)

Mutations	2012	2013	2014	2015	2016
L4W ou S	1	4	1		1
I5T		1		1	
I6L	1	1		1	
V7A ou L	1	1	1		1
D8G ou E			2		
V9A ou G	2	2			
Q10H ou R	1		1	1	
D12Y ou A ou N ou G			2	2	
F13V				2	
G17C ou D	1			1	1
V21A					1
L27P				1	
I31S			1		1
H43Y		1			
T47P ou A		4	2		
K48N				1	
D49G ou A ou Y	1	1		2	3
H51R ou P ou Y		1	1		4
H57D*	6	3	5	2	2
H57R			1	1	2



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

F58L ou S	2	1		1	
P62T ou L		1		3	
D63A			2		
Y64D			1		
S67P			1		
W68 C ou R		1			3
H71R ou Y ou P	2	4	9	2	
T76P				1	2
L85R ou P	2	1	1		
T87M	2	1	1		
T87M + N149D					1
V93A				1	
F94L			1		
Y95STOP	1				
K96Q ou T ou E ou N	2	2			3
G97C ou S ou R ou D	1		4	3	
Y99S			1		
A102V		1			
Y103STOP	1				
S104R	2			2	
F106S			1		
G108R	1				
T100P				1	
L116R ou P	2			1	
W119L ou C ou R		2	2	2	
L120R ou P		1	1		
R121P			1		
V125G					1
D126N					1
V128G		1			
G132D	1				
A134G ou V				1	1
T135P			3		
C138R		1			
V139M ou A	2	3			1
Q141P		3	5	2	
R140S ou P			2	2	1
Q141P					1
T142R ou M ou A		3			2
A146T ou V	2		3	5	
V155G ou M					2
L159R	3				
T160K		1			
T167I	4	1	2	1	1
M175V ou T ou K	1	2	2		
V180G					1
L182S				1	1
P77L + V131G		1			
Délétion dans <i>pnca</i>	8	4	4	1	2
Insertion dans <i>pnca</i>	5	5	7	8	2
Codon stop			1	2	1
Total mutations	58	59	72	55	43
PCR négatives	3	7	5	10	4
Pas de mutation	156	145	148	145	132
Total général	217	211	225	210	179

* 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 185 souches reçues en 2016** (souches MDR, et souches suspectes d'être MDR, par exemple, après rechute).

Des **mutations (Tableau 16)** ont été détectées chez **19 des 185 souches** (10%) dans **GyrA** (16 cas, 84%) ou **GyrB** (3 cas, 16%) (dont 1 avec une mutation dans GyrA et GyrB) (incluant 11 souches MDR résistantes aux



CNR-MyMRA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

quinolones, dont 6 XDR). Les codons impliqués **dominants** dans GyrA étaient les **codons 94 (n=8, 50%)**.
 On note : 5 souches sensibles aux quinolones qui portent un polymorphisme de *gyrA* ne conférant pas la résistance (T80A), et 3 souches sensibles aux quinolones et qui portent un polymorphisme dans GyrB (G559A) **ne conférant pas la résistance**.

En 2016, toutes les souches phénotypiquement résistantes aux fluoroquinolones avaient une mutation dans les gènes *gyrA* ou *gyrB*, ce qui confirme que la recherche de mutations dans ces gènes est une excellente approche rapide de détection de la résistance aux fluoroquinolones, antituberculeux essentiels dans le traitement des tuberculoses MDR.

Tableau 16 : Distribution des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA de 2010 à 2016 pour détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones (technique : séquençage *gyrA* et *gyrB*)

Gène	Mutations*	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<i>gyrA</i>	T80A**	5	3	1	2	5	1	5
	G88C ou A				1	1		
	D89N	1						
	A90V	3	3	7	11	12	3	1
	S91P	1	3			1		1
	D94A	3	3	7			1	1
	D94H		2				1	1
	D94G	2	1	8	12	22	11	3
	D94N		1	4		5	4	3
	D94Y	1	3		1	2	1	
	Q101E							
	T80A** + A90G				2			
	T80A** + A90E							
	A90V + D94Y							
	A90V + D94V		3					
	A90V + D94H			2				
	<i>gyrB</i>	S470I	1					
R467P**					1			
P478A**				1				
R485H								
S486Y			1					
D500A ou V						1		
D500N		1			1			
A506G								
R521G**							1	
D533A**							1	
N538D				1				
N538K				1				
E540V			3					
E540A		1						
E540D				1				
A543V		1					1	
A547V								
G551R						1		
G559A**			2	1	1		1	3
R485C + A543V			1			1		
<i>gyrA</i> + <i>gyrB</i>	D94A + A543V			1	1			
	A90V + A543V					1		
	A90V + I545S							1
Total mutations		20	28	36	33	51	27	19
Pas de mutation		108	155	194	175	177	209	164
Résultats non interprétables				6	7	4	2	2
Total général		128	183	231	215	232	238	185

* numérotation *M.tuberculosis* ; ** polymorphisme sans lien avec la résistance aux quinolones



Ethionamide (ETH)

Le séquençage des gènes *ethA* et *ethR*, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, est effectué depuis 2012. Il a été effectué **pour 70 souches en 2016**. Des mutations (**Tableau 17**) ont été détectées chez 30 souches (43%).

Tendances évolutives 2011-2016 : On note la très grande diversité des mutations identifiées dans EthA, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet de chacune de ces mutations. Des travaux spécifiques seront nécessaires pour avancer sur ce point.

Tableau 17 : Distribution des mutations des gènes *ethA* et *ethR* dans les souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2016 pour détection moléculaire de la résistance à l'ethionamide (technique : séquençage *ethA* et *ethR*)

Gène	Mutations	2012	2013	2014	2015	2016	
<i>ethA</i>	M1R				1		
	A19V (plus EthR-V199A)				1		
	G11D ou S	1	1	2			
	S15P				1		
	H22P	1					
	C27W		1				
	G42V + P334A	1					
	F48S		1				
	Y50C		1				
	S55C		1				
	G63D		1				
	F66L + G199D	1					
	G78D + wt	1					
	A89E + S266R						1
	D95N				1		
	R99G	1					
	W109STOP					1	
	G124D					1	
	C131Y					1	
	E132STOP						1
	L136R				1	1	
	G139D					1	
	Y140STOP	2					2
	Y147STOP	1					
	Q165P	4		1		1	
	H166P			1			
	W167G	2		1			
	W167STOP						
	W167S + S266R						
	I178S				1		
S183R				1			
P192S						1	
P192T						1	
V202G					1		
Q206STOP	1						
R207L						1	
S208STOP	1	1					
Y211C							
Y211S			1				
I212M					1		
V238G	1	1	1				
R239L			1				
Q254A					1		
P257S			2				
R261W	1						
S266R			3	2			
Q269STOP	2	2	1				



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

P275S					
H281P		1		1	2
C294Y			1	2	
I305N	1				
I305S					1
T314I				1	1
P334A				1	
I337V		1			
I338S		1		2	
T341I		1			
T342K					1
M372R		1			
N379D		1			
G385D	2				
C403R	1			1	1
G413D			1		
P422L		1		1	
L440P		1	1		
R441C					1
Q449R	1				
D464G		1			
R483T	1				
Délétion + I337V	1				
Délétion + D95N			2		
Délétions	12	13	17	16	9
Insertions	6	5	3	4	1
<i>ethR</i>					
T149A	1				
M102T + délétion <i>ethA</i>			1		
Zone intergénique					
-68 A->G	3		1	5	2
-66-65 ins CG	1				
<i>ethA</i> plus <i>ethR</i>					
<i>ethA</i> S266R, <i>ethR</i> D23G					1
<i>ethA</i> W167S + S266R, <i>ethR</i> S131R					1
<i>ethA</i> H22P, <i>ethR</i> F110L				1	
<i>ethA</i> plus zone intergénique					
<i>ethA</i> Q269STOP, -9 A->G					1
délétion dans <i>ethA</i> , -9 A->G					1
<i>ethA</i> A89E + R99Q + S266R, -9 A->G				1	
Total mutations	51	46	38	48	30
Pas de mutation	49	42	74	56	36
PCR négatives	3	3	7	2	4
Total général	103	91	119	106	70

Kanamycine, amikacine et capreomycine

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBRs® 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, **172 souches ont été étudiées en 2016**. Les résultats montrent la présence d'une **mutation** a1401g pour 7 d'entre elles (4%) et une mutation c1402t pour 2 d'entre elles, dont 2 XDR. Comme attendu, aucune des 4 souches MDR monorésistantes à la kanamycine ne portait de mutation dans *rrs*.

Ethambutol

Le système d'amplification-hybridation GenoType® MTBRs/ a été utilisé jusqu'en 2014 pour la recherche de mutations dans le gène *embB* à la position 306 qui a été associée à la résistance à l'éthambutol. En 2015, **nous avons de plus mis en place le séquençage complet du gène *embB* et de son promoteur**, qui permet la détection d'un plus grand nombre de mutations impliquées dans la résistance à l'éthambutol (par exemple, G406D/S/A/ ou C) (Référence : *Molecular Analysis of the embCAB Locus and embR Gene Involved in Ethambutol*



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Resistance in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis in France. Brossier F et coll. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Aug;59(8):4800-8.

Au total, **171 souches ont été étudiées en 2016**, montrant la présence d'une **mutation** du gène *embB* pour **44 d'entre elles (26%)** (Tableau 18). Parmi ces 44 souches, 26 (59%) avaient une mutation du codon EmbB-306 : M306V (n=14) et M306I (n=12). Les autres codons dominants dans EmbB étaient les codons 406 (n=4) et 497 (n=2), les autres étant plus rares.

Malgré le séquençage complet du gène *embB* en plus de l'étude de la position 306 de ce gène, seulement 80% des souches phénotypiquement résistantes à l'éthambutol sont détectées génotypiquement. C'est pourquoi nous avons décidé à de **procéder à l'avenir à l'étude systématique de la région intergénique *embC-embA* (=promoteur *embB*)**.

Tableau 18 : Distribution des mutations des gènes *embB* et son promoteur dans les souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2015 et 2016 pour détection moléculaire de la résistance à l'éthambutol (technique : GenoType®MTBDRsl, séquençage *embB* et zone intergénique *embC-embA*)

Gène <i>embB</i>	EmbB	2015	2016
	T215S	1	
	N296H		1
	M306V	32	14
	M306I	14	12
	V309F		1
	Y319C		2
	D328Y	1	
	Y334H	2	
	D354A	1	1
	P404S	1	
	G406A		3
	G406D ou S	3	
	G406C		1
	Q497K	2	
	Q497R		2
	E521A		1
	W322R + Y334H		1
	G406A + T212A	1	
<i>embB</i> et promoteur <i>embB</i>	N296H + -16c→T		1
	S297A + -16c→T		1
	Y334H + -12c→T		1
	G406S + -11c→a + -430g→c		1
	N296H + -12c→T		1
Total mutations		58	44
Pas de mutation		163	126
PCR négatives		1	1
Total général		222	171

2.4.2. Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries non tuberculeuses, tendances évolutives 2006-2016

232 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2016 ont été soumises à des tests de détection moléculaire rapide de la résistance, soit un nombre beaucoup plus important qu'en 2015 (n=150). Cette augmentation est liée à l'implantation récente de la bandelette GenoType NTM-DR en routine (Hain).

Espèces à croissance lente (140 souches) :

Détection génotypique de la résistance acquise à la clarithromycine parmi 135 souches du complexe MAC et 5 souches d'autres espèces à croissance lente) liée à des mutations de la région autour des nucléotides 2057 et 2059



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

du gène *rrl* codant l'ARN 23S, détectées par PCR-séquençage ou bandelette Genotype NTM-DR (Hain) :

- 12 souches portaient une mutation a2058c (*M.chimaera* (n= 1) et *M. intracellulare* (n=2)), a2058t (*M. avium* (n= 3)), a2058g (*M.intracellulare* (n= 1)), a2059c/g (*M. avium* (n= 3), *M. intracellulare* (n=1) et *M. simiae* (n=1)).

NB : certaines souches pour lesquelles un résultat de détection génotypique de la résistance à la clarithromycine était disponible grâce à des tests faits dès réception de la souche n'ont pas été soumises ultérieurement à un antibiogramme. Ceci explique les différences entre les chiffres donnés ici et ceux donnés dans le § 2.3.2.

Espèces à croissance rapide (92 souches)

- **résistance naturelle à la clarithromycine** de 31/31 pour *M.abscessus sensu stricto* T28, 14/14 pour *M.abscessus subsp. bolletii* liée à la présence et à la nature du gène *erm(41)* (cf. plus haut : résistance phénotypique)
- **résistance acquise à la clarithromycine** par mutation du gène *rrl* codant l'ARN 23S a2058g retrouvée chez 2 souches de *M.abscessus subsp. massiliense* isolées dans des prélèvements respiratoires et par mutation a2059g retrouvée chez la souche de *M. chelonae* responsable d'une infection cutanée (cf.§2.3.2)
- **résistance acquise aux aminosides** par mutation a1408g du gène *rrs* codant l'ARNr16S pour 5 souches de *M.abscessus* (2 *bolletii*, 2 *massiliense* et 1 *sensu stricto* T28) isolées dans des prélèvements respiratoires (cf § 2.3.2).

2.4.3. Détection de la résistance aux antibiotiques dans les cas de lèpre diagnostiqués en France, tendances évolutives

En 2016, nous avons reçu **74 biopsies** pour **60 patients** français ou résidents en France, ce qui confirme l'augmentation du recrutement observée depuis 2010 suite aux relations établies avec des collègues des DOM-TOM et des centres hospitaliers de métropole (tableau 19).

L'examen microscopique et la PCR étaient positifs pour 23 des 60 patients, soit 38% (26 biopsies positives sur 74, soit 35%) : 22 nouveaux cas et 1 cas déjà traité.

Ces patients vivaient dans les DOM-TOM (n=14 dont 11 à Mayotte dont 4 originaires des Comores ; 3 en Nouvelle Calédonie), ou étaient des immigrants résidant en France métropolitaine (total=9 dont 2 de Mayotte, 2 des Comores, 1 de Madagascar, 2 du Tchad, 1 du Sénégal, 1 du Cameroun).

Toutes les souches de *M. leprae* étaient multisensibles aux antilépreux, y compris celle isolée du cas déjà traité (patient des Comores suivi en métropole).

Analyse rétrospective des résultats 2001- 2016 cas de lèpres diagnostiqués en France

Durant les 16 années 2001-2016, nous avons reçu un total de 493 biopsies pour 359 patients suspects de lèpre, dont 217 biopsies positives par examen microscopique et amplification génique (44%) ce qui a permis le diagnostic de lèpre pour 181 patients (50 %) dont 59 en France métropolitaine et 122 dans les DOM-TOM.

Les patients étaient originaires des DOM-TOM (n=108, 60%), d'Afrique (n=55, 30.4%), d'Asie (n=9, 6%), d'Amérique (n=3, 2 %) ou de France métropolitaine mais ayant voyagé dans des régions d'endémie (n=6,4%).

Parmi les 181 cas, 147 étaient des nouveaux cas (81%) et 34 des patients déjà traités (19%).

Un antibiogramme moléculaire a été obtenu pour 175 (144 nouveaux cas et 31 rechutes) des 181 cas :

- 158 cas multisensibles
- 17 cas résistants (9,7%) dont 9 primaires (7 à DDS et 2 aux fluoroquinolones) et 8 secondaires (5 à DDS et 3 à rifampicine). Aucun cas de multirésistance n'a été détecté.

Le taux de résistance était donc en France de 6,2 % parmi les 154 nouveaux cas (R 1aire), et de 25,8% parmi les 31 rechutes (R 2aire). Comme dans la tuberculose, cette différence est très significative (P< 0.01).

La distribution des cas de résistances par lieu de naissance ou de contagé présumé (personne née en France mais ayant séjourné longuement en pays endémique, DOM-TOM ou étranger) est présentée dans le tableau ci-dessous.

Les cas résistants observés chez les patients résidant dans les DOM-TOM étaient autant primaires (n=7) que secondaires (n=8). Au contraire, les 2 seuls cas résistants observés chez les patients nés ou résidant à l'étranger étaient primaires, en cohérence avec ce qui est observé dans me programme de surveillance de l'OMS.



Résistance aux antilépreux chez les patients diagnostiqués en France, synthèse 2001-2016

Lieu de naissance ou contagé	Cas avec antibiogramme moléculaire			Dont cas résistants		
	Total	Nouveaux	Rechutes	Primaire	Secondaire	Mutations
DOM-TOM	109*	84	25	7 (6 Dds, 1 Fq**)	8 (5 Dds, 3 Rif****)	foIP : P55L (6), T53I (4) T53A (1) rpoB : S456L (2) S456F (1) gyrA : A91V (1)
Etranger	66*	60	6	2 (1 Dds, 1 Fq***)	0	foIP : P55L (1) gyrA : A91V (1)

Dds, dapsons; Rif, rifampicine; Fq, fluoroquinolone

* dont 6 patients nés en France métropolitaine mais ayant séjourné longuement en pays endémique, soit en DOM-TOM (n=1), soit à l'étranger (n=5 : 3 en Afrique, 2 en Asie)

** Nouvelle Calédonie ; *** immigrant du Brésil résidant en France ; **** 2 Martinique, 1 Tahiti

La grande majorité des mutations de résistance primaire concernent la dapsons (7 sur 9), ce qui n'est pas étonnant en raison de l'emploi très ancien, autrefois en monothérapie, de cet antilépreux, ce qui a occasionné des rechutes à bacilles résistants et des cas de transmission à partir de ces rechutes. **Cependant il faut noter 2 cas de résistance 1aire aux fluoroquinolones** (Nouvelle Calédonie ; immigrant du Brésil résidant en France) qui sont très probablement la rançon de l'emploi large de ces antibiotiques dans de nombreux types d'infections (urinaires, respiratoires...).

La majorité des mutations de résistance 2aire concernent la dapsons mais il faut noter 3 cas de résistance 2aire à la rifampicine dans les DOM-TOM (Martinique, Tahiti) ce qui suggère des défauts d'organisation des traitements dans ces régions.

Les différences observées entre les taux de résistance parmi les cas diagnostiqués en France et ceux observés dans les pays d'endémie lépreuse (cf nos travaux effectués pour une dizaine de pays d'endémie, dans le cadre du réseau OMS de surveillance de la résistance aux antilépreux) sont frappantes, primaire (8,3% vs 3%, $P=0,1$) et surtout secondaire (32% vs 0%, $P< 0.01$).

Dans les régions qui suivent la stratégie OMS, le traitement de la lèpre est standardisé depuis une trentaine d'années et les antilépreux sont fournis gratuitement sous une forme qui favorise la supervision et la compliance. Les taux de résistance 1aire y sont bas et il n'y a pas de résistance 2aire. Par contraste, dans les DOM-TOM où les patients sont pris en charge par des structures variées et mal coordonnées, les taux de résistance 1aire, et surtout de résistance 2aire, sont très élevés, suggérant des défauts importants d'organisation dans la prise en charge des patients, en tout cas dans le passé.



3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux

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

Caractéristiques des cas colligés à travers le réseau Azay-Mycobactéries

Les données recueillies en 2016 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2015 par 38 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries. Comme les deux dernières années, un laboratoire de CHU de la région Languedoc-Roussillon n'a pas été en mesure de fournir ses données.

Les 38 laboratoires du réseau ont colligé les données concernant **1516 cas de tuberculose à culture positive** qu'ils ont diagnostiqués en 2015, soit un nombre de cas très stable depuis ces dix dernières années alors que l'incidence de la tuberculose est légèrement à la baisse en France. La distribution des cas par région est donnée dans les Tableaux 19 (anciennes régions) et 19b (nouvelles régions).

Tableau 19a : Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 2007 à 2015 : distribution régionale des cas à culture positive (ancienne organisation régionale). Pour 2015, les données sont aussi exprimées en % du total des cas de l'année.

Régions	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	
									N	%
Alsace	35	40	50	39	55	36	37	50	55	3,6
Aquitaine	116	106	126	132	141	111	46	54	65	4,3
Auvergne	29	23	29	18	21	17	21	21	16	1,1
Bourgogne	23	29	24	17	22	19	22	24	20	1,3
Bretagne	14	22	17	12	15	64	67	58	48	3,2
Centre	18	24	15	12	32	22	25	26	26	1,7
Champagne Ardennes	6	16	15	13	13	13	17	21	9	0,6
Corse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Franche-Comté	16	17	12	11	10	18	14	31	19	1,2
Ile de France	712	712	780	747	773	820	825	783	776	51,2
Languedoc-Roussillon	57	53	31	42	45	52	17	18	28	1,9
Limousin	13	23	14	14	22	13	22	16	13	0,9
Lorraine	28	36	28	23	33	22	25	35	26	1,7
Midi-Pyrénées	91	57	55	0	0	0	0	38	30	2,0
Nord-Pas de Calais	35	35	44	42	51	42	34	32	52	3,4
Normandie Basse	25	34	34	31	31	38	25	23	25	1,6
Normandie Haute	41	40	36	39	19	28	52	46	36	2,4
Provence ACA	37	39	38	61	44	40	50	40	40	2,6
Pays de Loire	74	79	63	71	85	74	75	77	59	3,9
Picardie	24	26	22	20	28	18	31	24	20	1,3
Poitou-Charentes	16	18	23	17	18	16	16	16	23	1,5
Rhône-Alpes	139	141	117	126	123	113	126	137	130	8,6
TOTAL	1549	1570	1574	1487	1581	1576	1547	1570	1516	100%



Tableau 19b : Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 2007 à 2015 : distribution des cas à culture positive selon la nouvelle organisation régionale. Pour 2015, les données sont aussi exprimées en % du total des cas de l'année.

Régions	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	
									N	%
Auvergne-Rhône-Alpes	168	164	146	144	144	130	147	158	146	9,6
Bourgogne-Franche-Comté	39	46	36	28	32	37	36	55	39	2,6
Bretagne	14	22	17	12	15	64	67	58	48	3,2
Centre-Val-de-Loire	18	24	15	12	32	22	25	26	26	1,7
Corse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grand-Est	69	92	93	75	101	71	79	106	90	5,9
Haut-de-France	59	61	66	62	79	60	65	56	72	4,7
Ile-de-France	712	712	780	747	773	820	825	783	776	51,2
Normandie	66	74	70	70	50	66	77	69	61	4,0
Nouvelle-Aquitaine	145	147	163	163	181	140	84	86	101	6,7
Occitanie	148	110	86	42	45	52	17	56	58	3,8
Provence ACA	37	39	38	61	44	40	50	40	40	2,6
Pays-de-Loire	74	79	63	71	85	74	75	77	59	3,9
TOTAL	1549	1570	1574	1487	1581	1576	1547	1570	1516	100%

Les proportions des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2015 par les laboratoires de CHU du réseau Azay-mycobactéries selon les **antécédents de traitement (7,8% déjà traités)**, le **pays de naissance (66,0% nés à l'étranger)** et le **statut VIH (6,7% de co-infection)** sont présentées dans la **Figure 3**.

L'analyse de l'évolution depuis 1995 montre (Figure 3) :

- une **stabilité (<10%)** 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 quasi continue 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 67,2% en 2014 mais une stagnation à 66,0% en 2015,
- une **légère tendance à la baisse, de la proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+** depuis 1995, **mais une stabilité ces dernières années autour de 6%**. L'impact de l'épidémie du VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose est donc très modeste en France.

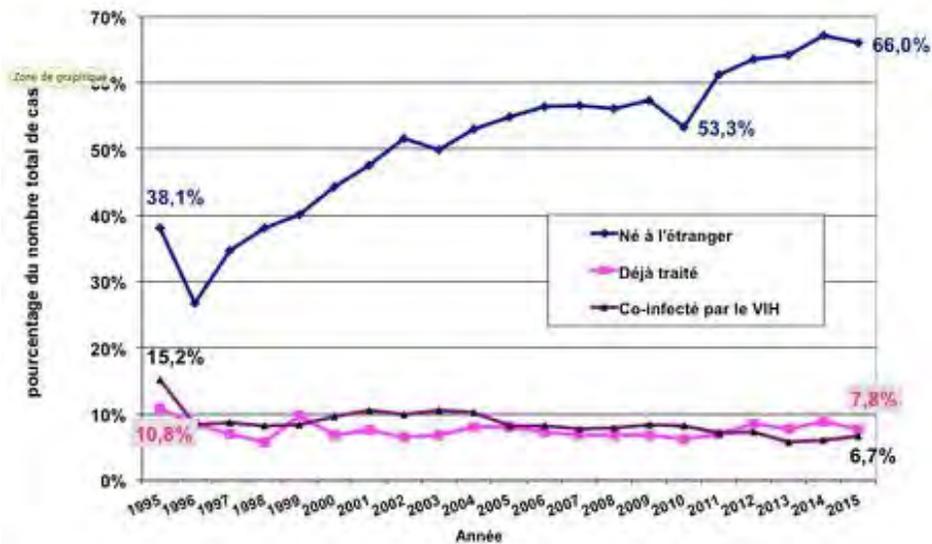


Figure 3 : Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2015

Sensibilité aux antituberculeux des cas colligés à travers le réseau Azay-Mycobactéries

La sensibilité à la rifampicine et l'isoniazide a été éprouvée pour 1486 des 1516 cas (98%) de 2015.

Résistance primaire

Pour les 1161 malades **sans antécédent de traitement** (nouveaux cas), le pourcentage global de résistance ("résistance primaire") à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était en 2015 de 14,1% (Tableau 20). Les données de 2015 confirment la tendance à la hausse par rapport aux dernières années (Figure 4).

Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (Tableau 20, Figure 5) était en 2015, comme toujours, beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 8,8%) et la streptomycine (SM 9,3%) que pour la rifampicine (RMP 2,8%) et l'éthambutol (EMB 2,0%).

Le pourcentage de résistance primaire à l'INH confirme la reprise de la hausse observée en 2014 après les deux années de baisse de 2012 (6,5%) et de 2013 (5,6%). C'est le pourcentage le plus élevé observé depuis le début de la surveillance en 1995 (3,7% en 1995) et il confirme la tendance temporelle à la hausse de la résistance primaire à l'INH depuis 20 ans, ce qui doit faire **renforcer les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie pour les nouveaux cas** et étudier l'impact potentiel sur les choix de thérapeutique dans la tuberculose latente

Comme les années précédentes, la quasi-totalité des souches résistantes à la rifampicine diagnostiquées en 2015 chez les patients sans antécédent de traitement (32/33) étaient aussi résistantes à INH (multirésistance). La souche résistante à RMP restante était monorésistante à RMP et isolée chez un patient né à l'étranger.

La proportion de cas **multirésistants « primaires »** mesuré en 2015 dans les CHU au travers le réseau Azay-mycobactéries (2,8%) est de nouveau un peu supérieure à celles des dernières années (2,2% en 2012, 1,7% en 2013 et 2,4% en 2014). Au total, 6 (18,8%) cas MDR « primaires » étaient séropositifs pour le VIH et tous étaient nés à l'étranger.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Résistance primaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance primaire à au moins un des 4 antituberculeux chez les 349 patients nés en France (**Tableau 20**) était de 8,9% alors qu'il était de 16,3% chez les 781 patients nés à l'étranger ($p=0,001$). Pour chaque antituberculeux, le pourcentage de résistance primaire était plus élevé chez les patients nés à l'étranger que chez ceux nés en France.

Tableau 20 : Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2015 parmi les nouveaux cas de tuberculose (résistance "primaire") et les cas déjà traités (résistance "secondaire") selon le pays de naissance (France/autres pays). Réseau Azay-Mycobactéries

Sensibilité	Nouveaux cas						Malades déjà traités					
	Total		France		Autres		Total		France		Autres	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Testées	1161	100	349	100	781	100	114	100	36	100	74	100
Sensible	997	85,9	318	91,1	654	83,7	77	67,5	27	75,0	48	64,9
Résistant	164	14,1	31	8,9	127	16,3	37	32,5	9	25,0	26	35,1
dont résistant à au moins :												
SM	108	9,3	23	6,6	81	10,4	29	25,7	7	19,4	22	29,7
INH	102	8,8	16	4,6	81	10,4	29	25,4	4	11,1	23	31,1
RMP	33	2,8	5	1,4	27	3,5	21	18,4	2	5,6	18	24,3
EMB	23	2,0	4	1,2	18	2,3	14	12,3	1	2,8	12	16,2
dont monorésistant à :												
SM	58	5,0	14	4,0	43	5,5	8	7,0	5	13,4	3	4,1
INH	39	3,4	5	1,4	32	4,1	4	3,5	0	0	3	4,1
RMP	1	0,1	0	0	1	0,1	0	0	0	0	0	0
EMB	2	0,2	1	0,3	1	0,1	0	0	0	0	0	0
dont MDR	32	2,8	5	1,4	26	3,3	21	18,4	2	5,6	18	24,3

SM : streptomycine ; INH : isoniazide ; RMP : rifampicine ; EMB : éthambutol.

Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 211 cas et le pays de naissance était inconnu pour 64 cas. Pour 30 souches, les antibiogrammes n'ont pas été réalisés. La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 4 cas et l'éthambutol pour 3 cas.

Résistance secondaire

Chez les 114 patients diagnostiqués en 2015 et ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage global de résistance (résistance "secondaire" ou "acquise") à au moins un des 4 antituberculeux était de 32,5%, soit près de 3 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas (**Tableau 20, Figure 4**). Ce pourcentage confirme la baisse observée en 2014 par rapport au chiffre le plus élevé des 20 ans de surveillance rapporté en 2013.

Pris séparément, les pourcentages de résistance "secondaire" à INH (25,4%) et RMP (18,4%) observés en 2015 sont aussi inférieurs à ceux de 2013 (**Figure 6**). Comme en 2013 et 2014, ces taux très élevés sont le reflet de la survenue de cas de tuberculose à bacilles MDR nés à l'étranger, qui représentent 21 des 114 cas (18,4%) de tuberculose chez les patients ayant déjà reçu un traitement.

Résistance secondaire et pays de naissance

Comme au cours des dernières années, **la très grande majorité des 21 cas de tuberculose à bacilles MDR « secondaires »** a été diagnostiquée chez des patients nés à l'étranger (**Tableau 20**). Toutefois, en 2015, 2 cas de tuberculose à bacilles MDR ont été observés chez des patients nés en France. De manière générale, la résistance « secondaire » à chacun des quatre antituberculeux pris isolément était rare chez les patients nés en France. Enfin,



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

parmi les cas MDR « secondaires », six étaient séropositifs pour le VIH dont 5 nés à l'étranger et un pour lequel le pays de naissance n'était pas connu.

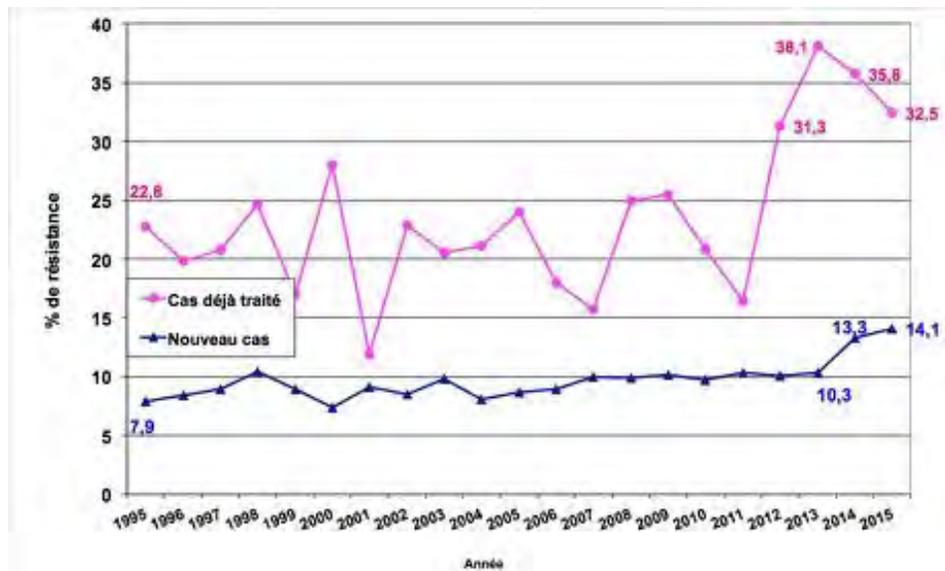


Figure 4 : Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance « primaire ») et les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2015

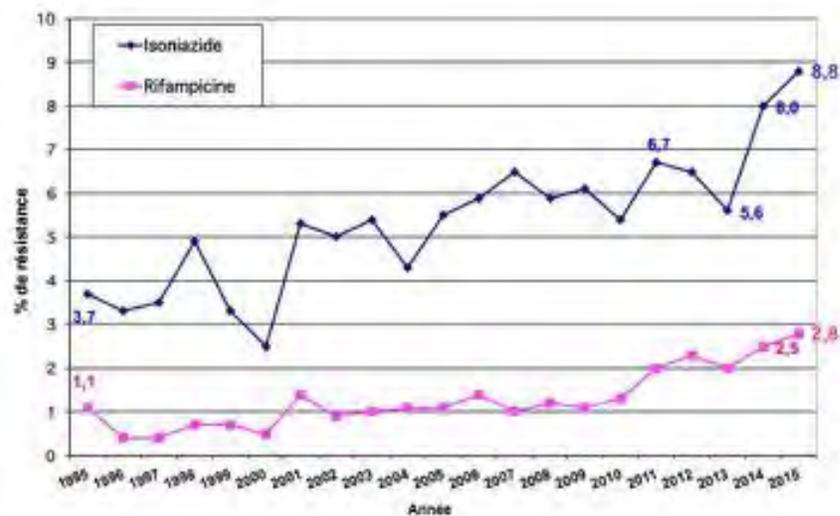


Figure 5 : Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2015

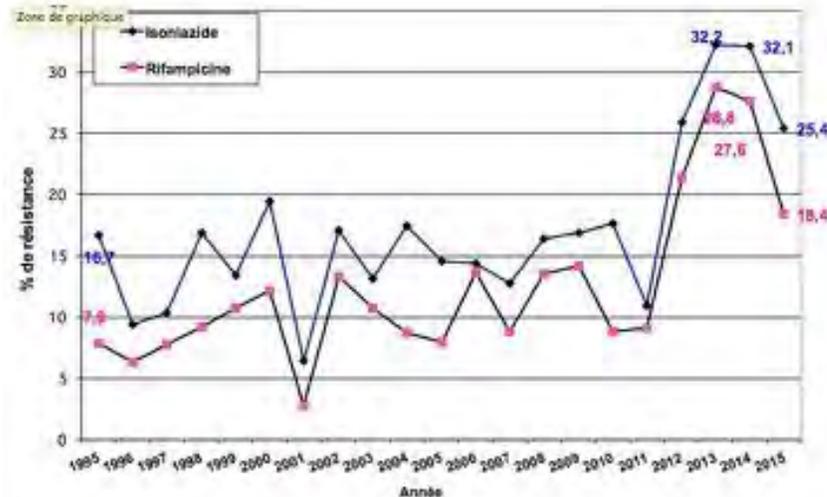


Figure 6 : Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2015

Monorésistance à la rifampicine

En 2015, une seule souche monorésistante à RMP a été isolée chez un patient né à l'étranger et jamais traité (résistance « primaire »), soit 0,1% du total des cas jamais traités. Ce patient était séropositif pour le VIH.

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

En 2016, le CNR-MyRMA a recueilli des données concernant les cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2015, à travers son réseau de laboratoire (réseau CNR-MyRMA). En raison des restructurations des laboratoires d'analyses qui se poursuivent depuis de nombreuses années, le réseau comportait **197 laboratoires** en 2015, soit 25 de moins qu'en 2014. Toutefois, les activités de mycobactériologie des laboratoires ont été en général transférées dans un laboratoire participant déjà au réseau.

Comme chaque année, les données ne sont pas tout à fait complètes au moment de rédiger le rapport d'activité (78% de réponse au questionnaire).

Les données colligées à ce jour **concernent 4276 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2015**.

La région Ile-de-France a diagnostiqué un peu moins de la moitié des cas documentés de 2015 (47%) et la région Rhône-Alpes 19%. Chacune des autres régions représentent de 0,2% à 4,3% du total des cas.

En 2015, les **10 laboratoires dont l'activité est la plus importante** ont diagnostiqué près de la moitié des cas (**48%**) de tuberculose (Figure 7) :

- ✓ 7 laboratoires de CHU (4 d'Ile de France et 3 d'autres régions),
- ✓ 1 laboratoire de sanatorium d'Ile de France
- ✓ 2 gros laboratoires privés



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)



Figure 7 : Distribution des laboratoires du réseau du CNR-MyRMA en fonction du nombre de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2015

Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants en 2015

Le nombre de **cas de tuberculose à bacilles multirésistants** diagnostiqués en 2015 en France par les 153 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour était de **95**, soit une **proportion de 2,2% (IC95 : 1,8%-2,7%) de l'ensemble des 4276 cas colligés (Tableau 21)**. **Ce nombre et cette proportion sont en baisse par rapport à 2014.**

Parmi ces 95 cas MDR, il y avait 1 cas déjà identifié en 2014 (cas à rechutes) et 94 cas diagnostiqués pour la première fois en 2015 en métropole.

Le pourcentage de cas MDR (2,2%) calculé sur les 4276 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par l'ensemble des laboratoires français qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) reste significativement ($p < 0,01$) inférieur à celui calculé sur les 1499 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les 38 laboratoires universitaires du réseau Azay-Mycobactéries (3,7% en cumulant les cas de résistance 1aire, 2aire et les cas avec antécédents inconnus ou douteux). Cette différence est très probablement liée au caractère spécialisé et de « recours » des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU.

Comme chaque année, quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA n'ont pas encore adressé leurs données 2015 malgré les relances ; toutefois, il est peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2015 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires. En effet, tous les nouveaux cas de métropole concordent avec les souches MDR reçues par le CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire (cf. plus haut « activités d'expertise »). Certains cas correspondent à des souches reçues au CNR-MyRMA mais pour lesquelles le laboratoire n'a pas encore donné le dénominateur (nombre total de cas à culture positive). La proportion estimée de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2015 est vraisemblablement inférieure à 2,2% si l'on considère les données en attente des laboratoires non déclarant qui ne concerneront très probablement que des cas de tuberculose non MDR.

Calculée pour chacune des régions de France (Tableau 21a et b), la proportion de cas multirésistants rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés dans chaque région était comprise entre 0 et 4,5% en 2015 selon l'ancienne organisation régionale, et 0% et 4,4% selon la nouvelle organisation.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Tableau 21a : Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2015 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA (ancienne organisation régionale).

Région	Total cas TB	Cas TB MDR	
		N	% du total
Alsace	83	2	2,4
Aquitaine	136	5	3,6
Auvergne	16	0	0
Bourgogne	30	0	0
Bretagne	85	2	2,4
Centre	73	1	1,4
Champagne Ardennes	20	0	0
Corse	-	1	-
Franche-Comté	19	0	0
Ile de France	2009	52	2,6
Languedoc-Roussillon	85	2	2,4
Limousin	22	1	4,5
Lorraine	45	2	4,4
Midi-Pyrénées	74	2	2,7
Nord-Pas de Calais	221	5	2,3
Normandie Basse	32	0	0
Normandie Haute	58	2	3,4
Provence ACA	118	3	2,5
Pays de Loire	104	3	2,9
Picardie	95	0	0
Poitou-Charentes	57	1	1,8
Rhône-Alpes	828	11	1,3
Départements d'outre-mer	66	0	0
Total	4276	95	2,2

Tableau 21b : Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2015 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA (nouvelle organisation régionale).

Région	Total cas TB	Cas TB MDR	
		N	% du total
Auvergne-Rhône-Alpes	844	11	1,3
Bourgogne-Franche-Comté	49	0	0
Bretagne	85	2	2,4
Centre-Val-de-Loire	73	1	1,4
Corse	-	1	-
Grand-Est	148	4	2,7
Haut-de-France	316	5	1,6
Ile-de-France	2009	52	2,6
Normandie	90	2	2,2
Nouvelle-Aquitaine	215	7	3,3
Occitanie	159	4	2,5
Provence ACA	118	3	2,5
Pays-de-Loire	104	3	2,9
Outre-Mer	66	0	0
Total	4276	95	2,2

Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants de 2015

Les caractéristiques des 94 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2015 en métropole sont les suivantes (n.b. les différences minimes d'effectifs et de distribution par pays de naissance,



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

comparativement à celle des souches MDR reçues en 2015 au CNR-MyRMA, cf tableau 9, sont dues au fait que quelques souches reçues ne correspondent pas à des nouveaux cas de 2015 et quelques souches reçues en 2016 correspondent à des cas diagnostiqués en 2015) :

- 71% étaient des hommes,
- 22 (23,4%) étaient nés en France, et 72 (76,6%) nés à l'étranger,
- parmi les 72 malades nés à l'étranger, 36 étaient nés en Europe de l'Est (dont 14 en Géorgie et 6 en Tchétchénie), 17 en Afrique sub-saharienne, 6 au Maghreb, 11 en Asie, et 2 en Amérique du Sud,
- l'âge médian était de 32 ans (2 cas de moins de 5 ans, 2 cas de plus de 65 ans, 26% de 15 à 24 ans et 27% de 25 à 34 ans),
- 14 (14,9%) étaient séropositifs pour le VIH, 70 (74,5%) étaient séronégatifs et 10 (10,6%) de statut VIH inconnu,
- 85% des cas avaient une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,
- 56% n'avaient jamais été traités (MDR « primaire »).

Tendances évolutives 1992-2015

Le pourcentage de cas multirésistants de 2015 est légèrement inférieur à celui de 2014 qui était le plus élevé depuis le début de la surveillance en 1992. Il reste toutefois un des plus élevés observés depuis 1992 (Tableau 22).

Tableau 22 : Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2015)

Année	Cas MDR	Total cas	% MDR	[IC95]
1992	48	8441	0,6	[0,4-0,7]
1993	40	8539	0,5	[0,3-0,6]
1994	58	7751	0,7	[0,5-0,9]
1995	40	7119	0,6	[0,4-0,8]
1996	29	6441	0,5	[0,3-0,6]
1997	26	5917	0,4	[0,3-0,6]
1998	39	5766	0,7	[0,5-0,9]
1999	48	5597	0,9	[0,6-1,1]
2000	51	5569	0,9	[0,7-1,2]
2001	48	5445	0,9	[0,7-1,2]
2002	79	5609	1,4	[1,1-1,7]
2003	77	5480	1,4	[1,1-1,8]
2004	68	5333	1,3	[1,0-1,6]
2005	65	5043	1,3	[1,0-1,6]
2006	61	4933	1,2	[0,9-1,5]
2007	44	4802	0,9	[0,7-1,2]
2008	57	4880	1,2	[0,9-1,5]
2009	48	4503	1,1	[0,8-1,4]
2010	47	4388	1,1	[0,8-1,4]
2011	75	4383	1,7	[1,3-2,1]
2012	94	4089	2,3	[1,9-2,8]
2013	82	4267	1,9	[1,6-2,4]
2014	110	4198	2,6	[2,2-3,2]
2015	95	4276	2,2*	[1,8-2,7]

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

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA est restée remarquablement constante dans la majorité des régions durant les années 2008-2015 (Tableau 23). En revanche, l'augmentation du nombre de cas dans la région Nord-Pas-de-Calais depuis 2012 se confirme alors qu'il existe une légère diminution dans les régions Rhône Alpes et Provence-Alpes-Côte d'azur en 2015 par rapport aux années 2011-2014. En Ile-de-France, reste à plus de 50 cas comme en 2014.



Tableau 23a : Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2008 à 2015 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA (ancienne organisation régionale).

Région	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL	% total
Alsace	2	1	2	3	4	5	4	2	23	3,8
Aquitaine	1	1	1	0	2	2	3	5	15	2,5
Auvergne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Bourgogne	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0,3
Bretagne	2	3	0	2	5	6	0	2	20	3,3
Centre	1	0	0	1	3	1	2	1	9	1,5
Cham. Ardennes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Corse	3	2	1	0	0	0	1	1	8	1,3
Franche-Comté	0	0	0	0	2	1	1	0	4	0,7
Ile de France	31	30	23	36	40	35	56	52	303	49,8
Languedoc-Roussillon	2	0	2	2	4	4	1	2	17	2,8
Limousin	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0,3
Lorraine	0	0	0	1	1	1	0	2	5	0,8
Midi-Pyrénées	0	1	0	0	1	1	3	2	8	1,3
Nord-Pas de Calais	1	1	1	1	5	1	6	5	21	3,4
Normandie Basse	0	0	3	1	0	0	1	0	5	0,8
Normandie Haute	0	0	1	1	0	2	6	2	12	2,0
Provence ACA	2	1	4	9	5	4	7	3	35	5,8
Pays de Loire	2	2	0	2	3	1	0	3	13	2,1
Picardie	1	0	1	0	2	2	0	0	6	1,0
Poitou-Charentes	1	1	0	0	5	1	0	1	9	1,5
Rhône-Alpes	7	5	5	14	11	14	17	11	84	13,8
Dép. d'outre-mer	1	0	2	1	1	1	1	0	7	1,2
Total	57	48	47	75	94	82	110	95	608	100

Tableau 23b : Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2008 à 2015 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA (nouvelle organisation régionale).

Région	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL	% total
Auvergne-Rhône-Alpes	7	5	5	14	11	14	17	11	84	13,8
Bourgogne-Franche-Comté	0	0	1	1	2	1	1	0	6	1,0
Bretagne	2	3	0	2	5	6	0	2	20	3,3
Centre-Val-de-Loire	1	0	0	1	3	1	2	1	9	1,5
Corse	3	2	1	0	0	0	1	1	8	1,3
Grand-Est	2	1	2	4	5	6	4	4	28	4,6
Haut-de-France	2	1	2	1	7	3	6	5	27	4,4
Ile de France	31	30	23	36	40	35	56	52	303	49,8
Normandie	0	0	4	2	0	2	7	2	17	2,8
Nouvelle-Aquitaine	2	2	1	0	7	3	4	7	26	4,3
Occitanie	2	1	2	2	5	5	4	4	25	4,1
Provence ACA	2	1	4	9	5	4	7	3	35	5,8
Pays de Loire	2	2	0	2	3	1	0	3	13	2,1
Outre-mer	1	0	2	1	1	1	1	0	7	1,2
Total	57	48	47	75	94	82	110	95	608	100

Comme en 2014, l'Ile-de-France cumule un peu plus de la moitié du total des cas MDR en 2015 (Figure 8).

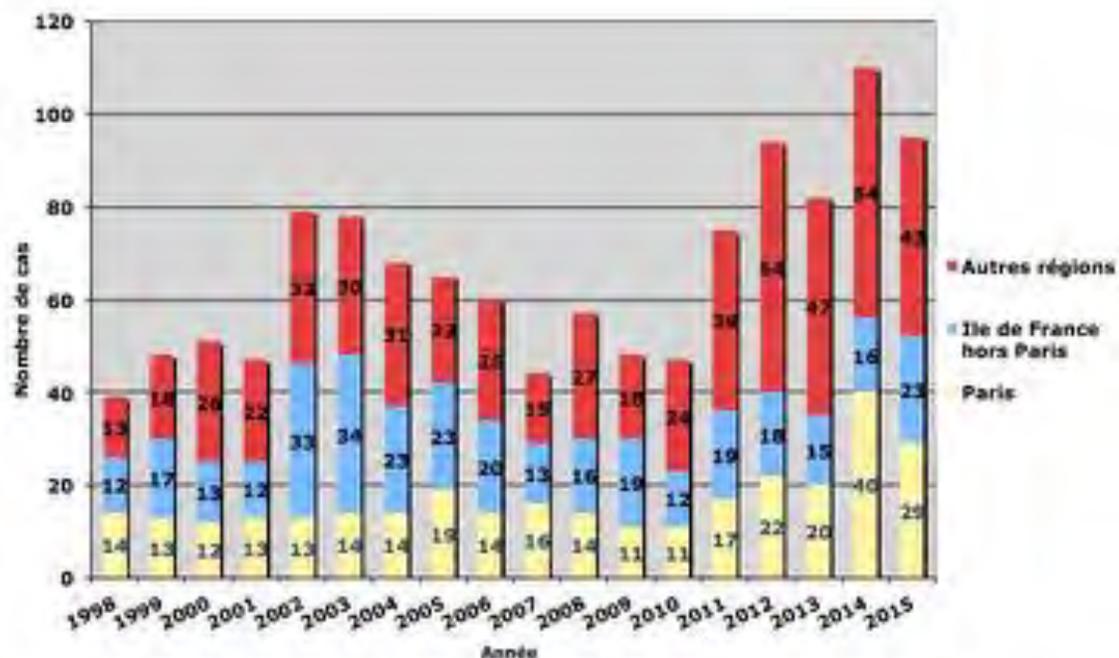


Figure 8 : Evolution 1998-2015 de la distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants selon la région du laboratoire signalant le cas : Paris, Ile de France, autres régions.

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées au cours des 23 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 24). Il faut noter **entre 1992 et 2011** une **diminution constante des proportions représentées par les hommes** (74% à 58%), **par les patients avec antécédents de traitement** (73% à 37%), et **par les patients nés en France** (48% à 9%). L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 53% à 90%) était liée aux patients nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en Afrique subsaharienne.

En 2012-15, s'est produit, par rapport aux cinq années précédentes, un **retour à une très grande majorité de cas de sexe masculin (74%) et plus de cas nés en Europe (52%) et sans antécédents de traitement 65%**, en raison de l'augmentation de cas de résistance primaire chez des hommes nés en Europe de l'Est et principalement en Géorgie.

Tableau 24 : Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 1992 à 2015

Caractéristiques	Périodes				
	1992-1996	1997-2001	2002-2006	2007-2011	2012-2015
N total cas recensés, dont :	215	211	351	275	384
- déjà connus CNR-MyRMA	43 (20%)	38 (18%)	40 (11%)	19 (7%)	9 (2%)
- recensés pour la 1 ^{ère} fois	172 (80%)	173 (82%)	311 (89%)	254 (92%)	375 (98%)
Parmi les cas recensés pour la 1^{ère} fois :					
Age médian	39 (16-88)	36 (3-85)	31 (0-95)	32 (0-82)	32 (0-83)
Sexe masculin	74%	65%	60%	58%	74%
Antécédents de traitement	73%	47%	38%	37%	35%
Atteinte pulmonaire	92%	91%	90%	84%	84%
Né à l'étranger, dont :	51%	65%	79%	83%	86%
- Europe	7%	8%	15%	31%	52%
- Maghreb	15%	19%	13%	7%	5%
- Afrique Sub-saharienne	17%	25%	39%	27%	18%
- Autres	13%	13%	13%	18%	11%



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Pays de naissance inconnu	0,5%	3%	3%	8%	1%
Examen microscopique (+)	58%	61%	62%	48%	57%
Résistance à l'éthambutol	33%	30%	35%	53%	62%
Résistance à streptomycine	54%	58%	63%	71%	74%

3.1.3. Etude de la prise en charge et du suivi des tuberculoses multirésistantes en France

L'objectif est de suivre et documenter le devenir des personnes atteintes de tuberculose à bacilles multirésistants (TB-MDR) en France et d'améliorer l'exhaustivité des dossiers du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » du CNR MyRMA (cf chapitre information, formation, conseil).

Le principe est d'enregistrer les modalités de prise en charge, de réunir les informations cliniques, bactériologiques, génomiques jusqu'à l'issue de leur traitement ainsi que les informations sur le devenir des patients durant deux ans après le début du traitement.

Pour cela, il était nécessaire de développer un **système de registre permettant la gestion de l'information des dossiers de chaque cas de TB-MDR**, robuste, simple et confidentiel adapté à l'enregistrement et au suivi des données cliniques, biologiques, thérapeutiques, incluant la tolérance aux traitements des tuberculoses MDR en France.

Ce projet de registre a reçu l'appui de la DGS. Le **financement partiel a permis la conception et la réalisation du logiciel de gestion du questionnaire informatisé partageable** entre les acteurs (cliniciens en charge des patients, laboratoire, CNR-MyRMA, groupe thérapeutique du CNR-MyRMA). **L'ensemble du questionnaire, maintenant finalisé**, a été développé avec la société Epiconcept sur le logiciel Voozanoo®. **Quelques fonctionnalités restent à développer.**

L'essentiel est maintenant de tester le système en grandeur nature (cf dossier de candidature 2017-21).

3.1.4. Surveillance de la tuberculose à *M. bovis*

Le CNR-MyRMA a effectué la surveillance de la tuberculose à *M. bovis* de 2012 à 2015 à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des laboratoires de CHU. Ce réseau dispose également des données pour l'année 2011 mais, pour cette première année, les laboratoires n'ont pas contrôlé rétrospectivement que l'information « espèce » était toujours saisie dans la base de données, ce qui a pu aboutir, cette année-là, à une sous-estimation du nombre de cas. Il faut noter de plus que quelques laboratoires du réseau n'identifient pas systématiquement les mycobactéries jusqu'à l'espèce et se limitent au complexe *M. tuberculosis*. Ceci explique que le dénominateur de la surveillance de *M. bovis* est à partir de 2013 légèrement inférieur à celui de la surveillance de la résistance aux antituberculeux. Finalement, les chiffres n'incluent pas les cas à « *M. bovis* BCG ».

En 2015, 19 cas de tuberculose à *M. bovis* ont été identifiés par les laboratoires du réseau AZAY, soit 1,7 % des 1131 souches pour lesquelles l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce : **2 étaient nés en France (âges 26 et 72 ans, 1 Picardie, 1 Val-de-Loire), 12 au Maghreb (âges 23 - 90 ans), 1 en Afrique sub-saharienne (19 ans), 1 en Europe de l'Ouest (84 ans) et 2 d'origine inconnue (33 à 47 ans).**

La proportion de *M. bovis* parmi l'ensemble des cas de tuberculose est stable, à un peu plus de 1% depuis 2011 (Tableau 25). L'extrapolation de ce % à l'ensemble des cas de tuberculose recensés en France suggère que le nombre total de cas de tuberculose à *M.bovis* serait de l'ordre de 50-60 par an.



Tableau 25. Nombre et pourcentage de tuberculose à *M. bovis* en France (réseau AZAY-Mycobactéries)

Année	2011	2012	2013	2014	2015
Nombre de cas <i>M. bovis</i>	19	28	10	16	19
Nombre de tuberculose à culture+*	1546	1530	1119	1179	1131
Pourcentage de <i>M. bovis</i>	1,2%	1,8%	0,9%	1,4%	1,7%
Nombre de laboratoire**	35	37	27	28	28

* total des cas pour 2011 et 2012 et à partir de 2013 uniquement les cas de tuberculose pour lesquels l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce

** total des laboratoires pour 2011 et 2012 et poursuivant systématiquement l'identification jusqu'à l'espèce à partir de 2013

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

Le CNR-MyRMA continue de recueillir le nombre de cas et l'incidence des méningites tuberculeuses (MTB) chez les enfants de 5 ans et moins car cela constitue un des indicateurs proposés par l'International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) pour juger de l'impact de la politique de vaccination par le BCG. En raison de la modification de la pratique du BCG en France introduite à la fin des années 1990, cet indicateur est recueilli chaque année depuis 2000 et les données sont ensuite croisées avec celle de Santé publique France pour approcher l'exhaustivité.

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

Le **Tableau 26** donne le nombre de cas de méningite à culture positive selon les années. Les données 2000 à 2011 ont été croisées avec celles de l'InVS. La confrontation des données 2012 à 2015 est en cours.

Aors qu'il y avait une stabilité depuis le début de la surveillance, il **semble y avoir une légère augmentation du nombre de cas à partir de 2012 qui se confirme en 2015**. La modélisation réalisée par l'InVS avant l'arrêt avait suggéré une augmentation possible du nombre de cas de méningite dans les 15 ans suivants la modification de stratégie vaccinale. Les données de la surveillance et celles de la modélisation imposent de continuer la surveillance.

Tableau 26 : Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2015.

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



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

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

Les données de génotypage des souches MDR reçues en 2016 (cf plus loin) ont été envoyées à l'ECDC (réseau ERLN-TB des CNR européens) et intégrés au rapport de l'ECDC publié en 2016 : <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/multidrug-resistant-tuberculosis-molecular-typing-surveillance.pdf>.

Le CNR-MyRMA participe régulièrement aux contrôles de qualité européens génotypiques et phénotypiques organisés par l'ECDC (cf. annexe).

3.2. Surveillance de la lèpre en France

Depuis les actions de motivation menées en 2012-2013 par le CNR-MyRMA auprès des interlocuteurs des DOM-TOM et la mission au dispensaire de léprologie de Mayotte (Mamoudzou), département français où la lèpre reste prévalente (~30 cas /an soit ~15 cas / 100 000 h), ainsi qu'auprès des dermatologues et infectiologues de métropole, nous avons reçu de nombreuses biopsies pour suspicion de lèpre. Ceci a permis de confirmer le diagnostic de **104 cas de lèpre entre 2013 et 2016 (23 cas en 2016)**.

Les cas découverts dans les **DOM-TOM représentent 56% du total dont 47% découverts à Mayotte** (cf tableau ci-dessous).

Les 44% restants ont été découverts en métropole chez des migrants résidant en France métropolitaine, venant de pays où la lèpre est prévalente (Indes, Sri Lanka, Pakistan, RDCongo, Mali, Sénégal, Madagascar, Comores, Tchad, Cameroun, Brésil, Haïti...)

Nombre et répartition géographique des cas de lèpre bactériologiquement documentés identifiés en France par le CNR-MyRMA de 2013 à 2015

	N cas	Nouveaux cas	Rechutes	DOM-TOM (Mayotte)	Métropole**
2013	24	18	6	18 (13)*	6
2014	31	26	5	17 (14)*	14
2015	26	22	4	16 (11)*	10
2016	23	22	1	14 (11)	9
Total	104	88	16	65 (49)	39

* Autres DOM-TOM : **2013** : 4 Nouvelle Calédonie, 1 de Guadeloupe ; **2014** : 1 Réunion, 2 Tahiti ; **2015** : 2 Tahiti, 3 Nouvelle Calédonie ; **2016** : 3 Nouvelle Calédonie

** Immigrants résidant en France métropolitaine, venant de pays où la lèpre est prévalente

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

En 2016, le CNR-MyRMA a réalisé le génotypage (empreintes digitales génomiques) de **171 souches** :

- **102 souches de *M.tuberculosis* non MDR**
- **69 souches MDR**

La méthode utilisée a été l'analyse MIRU-VNTR de 24 loci.



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

- suspicions de tuberculose nosocomiale ou de transmission dans des familles ou des collectivités, pour lesquelles le génotypage complète l'enquête épidémiologique « autour d'un cas » réalisée par les ARS et les structures de lutte antituberculeuse (CLAT),
- suspicions de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicions de contamination inter-prélèvements au laboratoire,
- études systématiques des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants, ce qui permet de participer au programme Euro-TB de l'ECDC.

3.3.1. Complément bactériologique des enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas non MDR »

En 2016, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser le génotypage (empreintes digitales génomiques) de **83 souches de *M.tuberculosis* non MDR (tableau 27)** en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT.

Il s'agissait de :

27 situations de suspicion de transmission en collectivité (total : 75 cas)

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas dans 21 situations et, au total, pour 52 des 75 cas (69%).

Les 21 situations comportaient chacune de 2 à 5 cas bactériologiquement reliés :

- 1 fois au sein d'une école (3 cas liés)
- 1 fois au sein d'une entreprise (3 cas liés)
- 1 fois dans une structure d'aide à l'enfance (2 cas liés)
- 1 fois dans deux foyers pour personnes en situation de précarité (5 cas liés)
- 1 fois au sein d'une prison (2 cas liés en 2016 et 2 cas liés en 2017)
- 4 fois au sein d'une famille (2 cas liés pour chaque situation)
- 12 fois dans un contexte communautaire (amis, voisinage, fréquentation du même salon de coiffure...).

3 situations de suspicion de transmission en milieu hospitalier (total : 8 cas)

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas pour 1 des 3 situations (au total pour 2 des 8 cas).

Les lignées phylogéniques en cause étaient surtout les lignées classiques nt, Haarlem et LAM.

Tableau 27 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* complex non MDR reçues au CNR-MyRMA en 2016, classés selon le contexte épidémiologique

Contexte	Lieu	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement	Lignée
Ecole	Saint Denis	3	3	LAM
Entreprise	Saint Briec	4	3	nt
	Créteil	2	0	
Structure d'aide à l'enfance	Paris	3	2	nt
Foyers précarité	Paris	9	5	Haarlem
Prison	Fresnes	2	2	H37Rv
Famille	Saint Denis	2	2	LAM
	Paris	2	2	Beijing
	Paris	2	2	Haarlem
	Paris	2	0	
	Strasbourg	2	2	Beijing
Communautaire	Evry	2	2	LAM
	Saint Denis (La Réunion)	5	5	nt



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

	Paris	2	2	Haarlem
	Maisons Alfort	2	0	
	Paris	2	0	
	Caen	6	2	nt
	Paris	2	2	Cameroon
	Strasbourg	3	3	Haarlem
	Strasbourg	3	3	Uganda
	Strasbourg	3	2	nt
	Montreuil	2	2	Delhi/CAS
	Paris	2	2	nt
	Paris	2	0	
	Rennes	2	2	Uganda
	Saint Brieu	2	0	
	Saint Denis (La Réunion)	2	2	EAI
Malade - malade	Brest	2	2	LAM
Malade - soignant	Strasbourg	2	0	
Malade - soignant	Melun	4	0	
Total		83	54	

Tendances évolutives 2006-2016

Comme le montre le **Tableau 28**, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage, en complément des enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT et les CCLIN, de 2006 à 2016 :

- 6 à 21 épisodes/an de cas groupés dans les familles et dans la communauté, **soit 160 épisodes en 11 ans totalisant 427 cas (2 à 13 cas par épisode)**.

- 1 à 5 épisodes/an de cas groupés en milieu de soins, **soit 29 épisodes en 11 ans totalisant 69 cas (2 à 7 cas par épisode)**.

L'utilisation de méthodes permettant la comparaison des génotypes au cours du temps (RFLP puis MIRU-VNTR 24 loci) est particulièrement importante pour identifier des chaînes de transmission s'étendant sur plusieurs années, comme le montre l'exemple de 13 cas liés identifiés sur une période de 3 ans (2012 à 2014, cf **tableau 28**)

Tableau 28 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* non MDR dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques dans les familles et la communauté et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2016 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage)

	Familles et communauté	Milieu de soin
2006	11 enquêtes (total : 28 cas suspects) 7 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 4 cas/épisode	6 enquêtes (total : 23 cas suspects) 3 épisodes confirmés : total 6 cas, 2 cas/épisode
2007	19 enquêtes (total : 50 cas suspects) 6 épisodes confirmés : total 23 cas, 2 à 5 cas/épisode	3 enquêtes (total : 9 cas suspects) 1 épisode confirmé : total 2 cas
2008	24 enquêtes (total : 65 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 45 cas, 2 à 10 cas/épisode	7 enquêtes (total : 21 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 13 cas, 2 à 7 cas/épisode
2009	12 enquêtes (total : 36 cas suspects) 12 épisodes confirmés : total 34 cas, 2 à 6 cas/épisode	6 enquêtes (total : 19 cas suspects) 5 épisodes confirmés : total 12 cas, 2 à 4 cas/épisode
2010	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 35 cas, 2 à 5 cas/épisode	7 enquêtes (total 15 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 9 cas, 2 à 3 cas/épisode



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

2011	22 enquêtes (total : 65 cas suspects) 17 épisodes confirmés : total 44 cas, 2 à 5 cas/épisode	4 enquêtes (total 13 cas suspects) 2 épisodes confirmés : total 4 cas, 2 cas/épisode
2012	27 enquêtes (total : 91 cas suspects) 21 épisodes confirmés : Total 64 cas, 2 à 10 cas/épisode	4 enquêtes (total 11 cas suspects) 3 épisodes confirmés : Total 6 cas, 2 cas/épisode
2013	26 enquêtes (total : 78 cas suspects) 14 épisodes confirmés : Total 50 cas, 1 à 8 cas/épisode À noter : 2 cas liés à 10 cas de 2012 ; 1 épisode de 5 cas liés à 4 cas de 2012 ; 1 épisode de 4 cas liés à 2 cas de 2012	1 enquête (total 3 cas suspects) 1 épisode confirmé de 3 cas, liés à 2 cas de 2012
2014	25 enquêtes (total : 61 cas suspects) 17 épisodes confirmés : Total 37 cas, 1 à 5 cas/épisode À noter : 1 cas lié à 10 cas de 2012 et 2 cas de 2013 ; 1 épisode de 3 cas liés à 1 cas de 2013 ; 1 épisode de 2 cas liés à 1 cas de 2013 ; 1 cas lié à 1 cas de 2013	3 enquêtes (total 19 cas suspects) 1 épisode confirmé de 2 cas liés
2015	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 13 épisodes confirmés : Total 26 cas, 1 à 3 cas/épisode À noter : 1 épisode de 1 cas lié à 4 cas de 2010, 1 épisode de 1 cas lié à 3 cas de 2012- 14 ; 1 épisode de 1 cas lié à 1 cas de 2014	5 enquêtes (total 13 cas suspects) 3 épisodes confirmés de 2, 2 et 4 cas liés
2016	27 enquêtes (total : 75 cas suspects) 21 épisodes confirmés : Total 52 cas liés, 2 à 5 cas/épisode À noter : 1 épisode de 2 cas liés à 2 cas de 2014, 1 épisode de 2 cas liés à 2 cas de 2017	3 enquêtes (total 8 cas suspects) 1 épisode confirmé de 2 cas liés

3.3.2. Suspensions de rechute

En 2016, le CNR-MyRMA a reçu **2 souches isolées en 2010 et 2016 chez un patient** suspect de rechute de tuberculose pour génotypage. La rechute n'a pas été confirmée par le génotypage (nouvelle contamination probable).

3.3.3. Suspicion de contamination inter-prélèvements au laboratoire

En 2016, le CNR-MyRMA a reçu **17 souches** correspondant à 5 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. **Le génotypage a confirmé la contamination au laboratoire pour 2 de ces 5 épisodes.** Ces 2 épisodes totalisaient 6 souches.

Tendances évolutives 2006-2016 (pour 3.3.2. et 3.3.3)

Comme le montre le **Tableau 29**, le CNR-MyRMA **a confirmé par génotypage de 2006 à 2016 :**

- 0 à 5 cas de rechute par an, soit **16 cas de rechute en 11 ans** sur un total de 27 suspicions (59%),

- 2 à 19 épisodes/an de **contamination inter-prélèvements au laboratoire** soit **97 épisodes en 11 ans** (totalisant 259 cas, 2 à 8 cas par épisode) sur un total de 147 épisodes suspects (66%). Il faut noter une diminution du nombre de cas de contaminations inter-prélèvements au laboratoire depuis 2 ans.

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



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Tableau 29 : 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 2016

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

3.3.4. Souches multirésistantes (MDR) et ultrarésistantes (XDR)

Nous avons en 2016 **analysé de manière systématique 70 souches MDR reçues au CNR-MyRMA par la technique du MIRU-VNTR 24 loci**. Cette technique permet à la fois une analyse phylogénique (identification des clades ou lignées ou phylums) et l'identification de cas potentiellement reliés (empreintes digitales génomique).

Sur le plan phylogénique (tableau 30), on voit que la proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing, qui avait plus que doublé entre 2006 (11/57, 19%) et 2013 (41/83, 49%) en relation avec l'augmentation de la part des cas qui concernait des patients nés en ex-URSS (en particulier en Géorgie), puis était redescendu à 35% (34/98) en 2015, était de 44% (30/70) en 2016. Cette ré-augmentation de la proportion des souches Beijing au sein des souches MDR s'est produite malgré une diminution du nombre absolu de souches MDR Beijing en 2016 contre 34 en 2015, à cause d'une forte diminution en 2016 du nombre de cas à souches LAM (12 en 2016 contre 22 en 2015) et T1-T2-T3 et « nt » (3 en 2016 contre 20 en 2015). **Il y a bien une diminution progressive du nombre de cas de tuberculose MDR causés par des souches Beijing depuis 2014.**

Tableau 30 : Evolution de 2006 à 2016 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

jaune, lignées 1, 2 et 3, et en vert lignée 4)

Années	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	Total
Groupe PGG1												
EAI	2	1	0	0	0	0		2	3			8
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	4	1	1	1	2	13
Beijing	11	9	15	17	19	23	38	41	52	34	30	289
West African 2	1	1	0	0	0	0	1	1				4
West African 1	0	0	0	0	0	1				1		2
Canetti	1	0	0	0	0	0						1
Groupe PGG2												
Haarlem et X	5	0	2	2	2	3	2	10	9	10	6	51
LAM	5	7	3	3	4	8	16	10	19	22	12	109
URAL	4	0	2	1	0	1	2	3	4	2	2	21
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0		1		1	1	5
S	2	2	3	1	3	3	3	2	1	2	3	25
Cameroon	2	2	3	1	3	1	3				2	17
Ghana (T1)	4	1	5	6	2	3	1	1	3	4	7	37
H37Rv											1	1
T1-T2-T3 et « nt »	19	14	18	19	12	19	21	11	18	20	3	175
Divers												
NEW-1	0	0	0	0	0	1						1
<i>M. bovis</i>	0	0	0	0	0	1				1	1	3
Total	57	37	51	52	45	67	91	83	110	98	70	761

Sur le plan de la comparaison de souches (empreintes digitales génomiques), l'analyse des souches 2016 révèle l'existence de **29 « clusters »** pour un total de **40 des 69 souches (58%) partageant des codes MIRU 24 identiques**.

En prenant en compte les MIRU de la période 2010-2016, la majorité des souches en cluster détectées en 2016 sont rattachées aux lignées Beijing (n = 21, 30% ; en 13 groupes contenant au maximum 5 souches), LAM (4 groupes : 1 groupe de 2 souches de 2016 et 3 groupes de 1 souche de 2016 liées à des souches des années précédentes), Ghana (3 groupes : 2 de 2 souches, et 1 souche de 2016 liée à 1 souche des années précédentes), Haarlem (2 groupes contenant chacun 1 souche de 2016 liée à des souches des années précédentes) et Cameroon (1 groupe de 2 souches). Les autres clusters sont rattachés aux lignées X, URAL, Ugandal, Cameroon, L4 (« nt ») et H37Rv (en 1 groupe contenant 1 souche de 2016 pour chaque lignée). Enfin, 1 souche de *M.bovis* de 2016 est en cluster avec 1 souche étudiée en 2010.

La technique **MIRU 24 loci n'étant pas très discriminante pour la lignée Beijing**, le regroupement de souches en cluster au sein de cette lignée doit être analysé avec prudence avant de conclure à un lien bactériologique, et bien sûr davantage encore à un lien épidémiologique. **Chaque cluster a donc été analysé en tenant compte** : (a) des caractéristiques des souches (phénotype et génotype de résistance) et (b) des caractéristiques des patients (pays de naissance, ville où le diagnostic a été fait, liens familiaux) et du résultat du **typage complémentaire des souches Beijing par analyse de 4 loci supplémentaires dits « hypervariables »** introduite en 2015.

Clusters rattachés à la lignée Beijing

1 cluster de 5 souches de 2016, dont :

- 4 souches de patients originaires de Russie (n=1), Roumanie (n=1), Tchétchénie (n=1) et Ukraine (n=1), indistinguables par « MIRU hypervariable complémentaire », mais **distinctes** par les phénotypes et génotypes de résistance,
- 1 souche d'un patient originaire du Maroc, indistinguishable des 4 précédentes par « MIRU hypervariable complémentaire », mais **distincte** par les phénotypes et génotypes de résistance.



Ces 5 souches non reliées (phénotypes et génotypes différents) appartiennent à un cluster phylogénique (CC 100-32) de 62 souches isolées durant la période 2011-2016 de patients majoritairement nés en ex-URSS ou autres pays de l'Europe de l'Est.

1 cluster de 3 souches de 2016

- 3 souches de patients originaires de Géorgie, Tchétchénie et Algérie, **distinctes** par « MIRU hypervariable complémentaire » et par les phénotypes et génotypes de résistance.

Ces 3 souches non reliées (phénotypes et génotypes différents) appartiennent à un cluster phylogénique (CC 94-32) de 58 souches isolées durant la période 2011-2016 chez des patients majoritairement nés en ex-URSS.

Pour le patient Géorgien de 2016, un **lien très probable** existe avec 2 cas de 2013 nés en Géorgie dans un contexte de transmission familiale. L'enquête épidémiologique montre que cette transmission **n'a pas pu se faire en France**.

1 cluster de 2 souches de 2016

- 2 souches de patients originaires de Mongolie et du Tibet, **distinctes** par « MIRU hypervariable complémentaire » et par les phénotypes et génotypes de résistance.

Ces 2 souches appartiennent à un cluster phylogénique (CC 342-32) de 5 souches MDR isolées durant la période 2011-2016, incluant 2 patients originaires de Mongolie et un patient né en France. **La souche de 2016 du patient né en Mongolie est indistinguable d'une souche de 2012 d'un autre patient né en Mongolie**. Une enquête épidémiologique est en cours.

1 cluster de 2 souches de 2016

- 2 souches, l'une d'un patient originaire de Géorgie et l'autre, d'un patient né en France, **indistingables** par « MIRU hypervariable complémentaire » et par les phénotypes et génotypes de résistance. Un **lien épidémiologique a été clairement établi** par l'enquête épidémiologique (transmission au travail).

9 clusters contenant 1 souche de 2016, reliée à des souches isolées durant la période 2011-2016 :

- 1 souche d'un patient originaire du Nigeria. Cette souche appartient à un cluster phylogénique (CC 1065-32) de 18 souches isolées de patients majoritairement nés en ex-URSS durant la période 2012-2016. Il est à noter que la souche de 2016 isolée chez le patient du Nigeria est **distincte** par « MIRU hypervariable complémentaire » des 4 souches du cluster isolées en 2015 pour lesquelles le MIRU hypervariable a également été déterminé. La souche de 2016 est également **distincte** par phénotype et génotype de résistance des autres souches du cluster.

- 1 souche d'un patient originaire de Bulgarie, reliée à un cluster phylogénique (CC 4737-32) de 3 souches isolées en 2013-2014 chez des patients nés au Sri Lanka, en Arménie et en Géorgie. La souche de 2016 est **distincte** par phénotype et génotype de résistance des 3 autres souches,

- 1 souche d'un patient né en France, reliée à une souche isolée en 2015 chez un patient originaire d'Ukraine. La souche de 2016 est très similaire par « MIRU hypervariable complémentaire » et **indistingable** par phénotype et génotype de résistance de la souche de 2015, Un **lien épidémiologique a été clairement établi** par l'enquête épidémiologique (transmission communautaire).

- 1 souche d'un patient originaire de Russie, reliée à 2 souches isolées (i) en 2013 chez un patient né au Népal, et (ii) en 2015 chez un patient né en Géorgie. Les 3 souches sont **distinctes** par « MIRU hypervariable



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

complémentaire » et par phénotype et génotype de résistance.

- 1 souche d'un patient originaire de Tchétchénie, reliée à une souche isolée en 2015 chez un patient originaire de Russie. Les 2 souches sont **distinctes** par phénotype et génotype de résistance.

- 1 souche d'un patient originaire du Tibet, reliée à une souche isolée en 2015 chez un patient également originaire du Tibet. Les 2 souches sont **indistingables** par phénotype et génotype de résistance. Le lien entre les deux souches a été **confirmé par séquençage complet des génomes des 2 souches** qui présentent un nombre très faible de différences (2 SNP) L'enquête épidémiologique est en cours pour confirmer une **probable transmission communautaire**.

- 1 souche d'un patient originaire du Vietnam reliée à une souche isolée en 2014 chez un patient également originaire du Vietnam. Les 2 souches sont **distinctes** par phénotype et génotype de résistance,

- 1 souche d'un patient originaire d'Ukraine, reliée à une souche isolée en 2012 chez un patient également originaire d'Ukraine. Les 2 souches sont **indistingables** par phénotype et génotype de résistance. Un **lien épidémiologique est probable** entre ces 2 cas, mais la **transmission n'a pas pu se faire en France**.

- 1 souche d'un patient né en France, reliée à une souche isolée en 2015 chez un patient originaire de Russie. La souche de 2016 est très similaire par « MIRU hypervariable complémentaire » (3 loci identiques sur 4) et **indistingable** par phénotype et génotype de résistance de la souche de 2015, Un **lien épidémiologique a été clairement établi** par l'enquête épidémiologique (transmission à l'hôpital)

Clusters rattachés à la lignée LAM

1 cluster de 2 souches de 2016

- 2 souches isolées en 2016 de 2 patients nés en France, très similaires par leurs codes MIRU (22 loci identiques sur 24) et **indistingables** par phénotype et génotype de résistance, Un **lien épidémiologique a été clairement établi** par l'enquête épidémiologique (transmission communautaire)

3 clusters contenant 1 souche isolée en 2016, reliée à des souches isolées durant la période 2011-2016

- 1 souche d'un patient originaire de Russie, reliée à un cluster phylogénique (843-52) de 12 souches isolées durant la période 2011-2015. Cette souche est **distinguable** par phénotype et génotype de résistance ;

- 1 souche d'un patient né en France, reliée à 3 souches isolées en 2015 (n=2) et 2013 (n=1) de patients originaires du Maroc. Les 3 souches isolées avant 2016 sont distinctes par leurs phénotypes et génotypes de résistance. En revanche, la souche du patient de 2016 est **indistingable** de celle de 2013. Un **lien épidémiologique probable** existe avec le cas de 2013 dans le cadre d'une transmission communautaire (voisinage).

- 1 souche d'un patient né en France, reliée à un cluster phylogénique (10571-67) de 3 souches isolées (i) en 2010 et en 2011 chez 2 patients originaires du Portugal, et (ii) en 2011 chez un patient né en Afrique. Les 4 souches sont **indistingables** par phénotype et génotype de résistance. Un **lien épidémiologique est probable** (même région). L'enquête de terrain est en cours.

Cluster de souches Haarlem

2 clusters contenant 1 souche de 2016, reliée à des souches isolées durant la période 2010-2015 :

- 1 souche d'un patient né en Algérie, reliée uniquement par MIRU à 1 souche **non MDR** isolées en 2010, sans lien



épidémiologique connu.

- 1 souche d'un patient né en Polynésie Française, reliée par MIRU à 1 souche isolée en 2015 d'un patient également originaire de Polynésie Française. Un **lien épidémiologique est probable** (même région). L'enquête de terrain est en cours.

Cluster de souches X

1 cluster de 1 souche de 2016

- 1 souche d'un patient né en France, **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance de 2 souches de deux patients originaires de France (2014) et du Portugal (2015). Le **lien épidémiologique est prouvé** entre ces 3 patients (transmission communautaire, voisins).

Cluster de souches Ghana

1 cluster de 2 souches de 2016

- 2 souches de patients originaires l'un de France, et l'autre de Côte d'Ivoire. Ces 2 souches isolées en 2016 sont reliées à 2 autres souches isolées en 2011 et provenant de 2 patients également originaires de France (mais résidant en Côte d'Ivoire) et de Côte d'Ivoire, mais **distinctes** par les phénotypes et génotypes de résistance.

1 cluster de 1 souche de 2016

- 2 souches de patients originaires de France et de Côte d'Ivoire, reliées à un cluster phylogénique (CC 67-25) de 3 souches isolées durant la période 2012-2015 chez un patient né en France (2015) et 2 patients nés en Côte d'Ivoire (2012 et 2015). Les 2 souches de 2016 sont **distinctes** par phénotype et génotype de résistance (a) entre elles et (b) des autres souches du cluster.

1 cluster de 1 souche de 2016

- 1 souche d'un patient né au Sénégal, reliée par MIRU à une souche d'un patient également originaire du Sénégal isolée en 2014. La souche de 2016 est très similaire par phénotype et génotype de résistance de la souche de 2014, Un **lien épidémiologique hors de France est probable** entre ces 2 patients. L'enquête est en cours.

Cluster de souches Cameroon

1 cluster de 2 souches de 2016

- 1 souche d'un patient né au Soudan, **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance d'une souche d'un patient né en Somalie. Un **lien épidémiologique est possible** entre ces 2 patients, mais devra être mis en évidence par l'enquête épidémiologique en cours.

Cluster de souches Uganda

1 cluster de 1 souche de 2016

- 1 souche d'un patient né en Albanie, **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance d'une souche d'un patient également originaire d'Albanie, isolée en 2015. Le **lien épidémiologique est prouvé** entre ces 2 patients (transmission intrafamiliale).

Cluster de souches Ural

1 cluster de 1 souche de 2016



- 1 souche d'un patient originaire de Moldavie, reliée à un cluster phylogénique (CC 163-15) de 4 souches isolées durant la période 2012-2015 chez des patients originaires de Russie (2012), de Géorgie et d'Ukraine (2013) et de Roumanie (2014). La souche de 2016 est **distincte** par phénotype et génotype de résistance des autres souches du cluster.

Cluster de souches de la lignée 4 (dites « nt » pour non typables)

1 cluster de 1 souche de 2016

- 1 souche d'un patient originaire d'Angola, reliée à un cluster phylogénique (CC 677-66) de 6 souches isolées durant la période 2011-2014 chez des patients originaires de la région du Congo. Toutes ces souches, qui sont **indistingables** par leurs génotypes/phénotypes, sont caractérisées par un profil génotypique particulier par la présence d'une mutation Q269 dans le gène *ethA*. Aucun lien épidémiologique n'a pu être établi à ce jour.

Cluster de souches H37Rv

1 cluster de 1 souche de 2016

- 1 souche d'un patient né en France, reliée par MIRU à un cluster phylogénique (CC 15456-62) **non MDR** de 5 souches isolées sur la période 2012-2015, Aucun lien épidémiologique n'a pu être établi.

Cluster de souches M. bovis

1 cluster de 1 souche de 2016

- 1 souche d'un patient né en Algérie, reliée par MIRU à une souche **non MDR** isolée en 2013. Aucun lien épidémiologique n'a pu être établi.

L'analyse détaillée des **29 clusters** génotypiques, totalisant **40 souches** MDR-XDR de 2016, a permis de confirmer un **lien bactériologique et épidémiologique pour 7 clusters, totalisant 8 cas MDR et 1 XDR de 2016 et 5 cas MDR et 1 XDR des années antérieures**. Une **enquête épidémiologique est actuellement en cours pour 6 autres clusters, totalisant 6 cas MDR et 1 XDR de 2016 et 4 cas MDR et 3 XDR des années antérieures** (Tableau 31).

Les cas MDR reliés bactériologiquement et épidémiologiquement identifiés en 2016 ont concerné les lignées Beijing, LAM, X et Uganda. Des enquêtes sont encore en cours pour les lignées Haarlem, Ghana et Cameroon.

Tendances évolutives 2006-2016

Le **Tableau 31** résume les **grappes de cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement** parmi les **souches de M.tuberculosis multirésistantes (MDR)** reçues au CNR-MyRMA de **2006 à 2016**, identifiées par génotypage systématique.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Tableau 31 : Résultats du génotypage systématique des souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA, 2006-2016

	N	Cas reliés* (contexte, pays de naissance)	Lignée
2006	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)	n.d.
2007	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal)	LAM
		1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)	n.d.
2008	51	1 épisode de 3 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
2009	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
		1 épisode de 2 cas (famille, Côte d'Ivoire)	Ghana
2010	45	1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
		1 épisode de 2 cas (famille, Tibet)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (famille, Mongolie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (famille, Viêt-Nam)	Beijing
2011	67	1 épisode de 3 cas (famille, Arménie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (malade vers soignant, France)	Cas-Delhi
		1 épisode de 3 cas (famille, Algérie)	nt
		1 épisode de 2 cas possible (famille, Roumanie)	URAL
		1 épisode de 2 cas possibles (contact occasionnel, France)	LAM
2012	92	1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (famille, France)	nt
		1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie)	LAM
		1 épisode de 4 cas (famille Congo et université française)***	LAM
2013	83	1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 1 cas (famille, Géorgie) §	Beijing
		1 épisode de 1 cas (famille, Guinée) §	Beijing
		1 épisode de 1 cas (foyer, Arménie) §	Beijing
		1 épisode de 1 cas XDR (lieu de travail, France) §	Beijing
		1 épisode de 1 cas (lieu de travail, Algérie) §	S
		1 épisode de 1 cas (famille, Sénégal) §	nt
1 épisode de 1 cas (communautaire, RDC)*** §	LAM		
2014	111	1 épisode de 2 cas XDR (Hôpital, Géorgie et France)	Beijing
		1 épisode de 2 cas XDR (Hôpital, Géorgie et France)	Beijing
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Russie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, Thaïlande et France)	EAI
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, France)	LAM
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Arménie)	URAL
		1 épisode de 2 cas MDR (désocialisation, France et Maroc)	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (lien imprécis, Roumanie et Chine)	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, Roumanie)	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (communautaire, Corse)**	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (Foyer, France et Pologne) §	LAM
		1 épisode de 6 cas MDR (famille, France)	LAM
1 épisode de 2 cas MDR (famille, RDC) §	LAM		
1 épisode de 1 cas MDR (famille et communauté, RDC)*** §	LAM		
1 épisode de 3 cas MDR (famille, travail, Maroc et France)	Haarlem		
1 épisode de 1 cas MDR (famille, France et Algérie) §	Haarlem		
1 épisode de 3 cas MDR (famille, Allemagne, France)	nt		
1 épisode de 2 cas MDR (communautaire, Corse)** §	nt		
1 épisode de 2 cas MDR (famille, communautaire, Brésil-Portugal) §	X		
2016	70	1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Mongolie) §	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (lieu de travail, France et Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (communautaire, France et Ukraine) §	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Tibet) §	Beijing
		1 épisode de 1 cas XDR (hôpital, France et Russie) §	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (amis, France)	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (voisins, France et Maroc) §	LAM
		1 épisode de 1 cas XDR (enquête en cours, France, Portugal et Afrique) §	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Polynésie) §	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (voisins, France et Portugal) §	X
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Sénégal) §	Ghana
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Soudan et Somalie)	Cameroon
1 épisode de 1 cas MDR (famille, Albanie) §	Uganda		



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

* sur la base des empreintes digitales génomiques (méthodes : RFLP ou MIRU 24 loci, mutations conférant la résistance).

** appartiennent à un même cluster de 13 cas (famille et milieu de travail clos et étroit en Corse) étalés sur 8 ans.

*** appartiennent au même cluster de 6 cas (famille et communautaire) étalés sur 4 ans.

§ cas lié(s) avec un/des cas des années précédentes

Le nombre de grappes de cas reliés a augmenté de 1 à 2/an en 2006-2009 à 5 en 2010-12, 7 en 2013, 11 en 2014, 9 en 2015 et 7 en 2016 (sans compter les 6 grappes de cas pour lesquels l'enquête épidémiologique est en cours). Ceci est dû (a) à l'augmentation du nombre de cas MDR et (b) à l'accumulation des données sur plusieurs années qui permet l'identification de clusters s'étendant sur plusieurs années.

A la différence de 2014 et 2015 (prédominance de transmission intrafamiliale), la transmission de la maladie parmi les cas reliés est variée en 2016, à savoir :

- 1 transmission intrafamiliale
- 1 transmission entre amis
- 2 épisodes de transmission entre voisins
- 1 transmission en milieu « communautaire » non familiale
- 1 transmission sur le lieu du travail
- 1 transmission nosocomiale

Les 3 lignées dominantes sont :

- nt : 11 épisodes, 24 cas
- Beijing : 17 épisodes, 31 cas
- LAM : 12 épisodes, 30 cas.

Les autres lignées (URAL, Ghana, Cas-Dehli, EIA, S, X, Uganda) sont très rares.



4. Alertes

Le CNR-MyRMA est intervenu en 2015 dans le cadre des alertes suivantes

4.1. Tuberculose

Le CNR-MyRMA a été en contact avec les autorités sanitaires **pour 22 épisodes de cas de tuberculose groupés** pour lesquels les études de génotypage (empreintes digitales génomiques) avaient permis de conclure, en complément des enquêtes de terrain, à des liens bactériologiques et épidémiologiques (**cf section 3 « Surveillance »**). Ces cas ont fait l'objet de nombreux échanges téléphoniques et de 27 courriers notamment avec les CLAT correspondants.

4.2. Mycobactérioses

1. Suivi des signalements d'endocardites à mycobactéries non tuberculeuses avec l'institut de Veille Sanitaire, le Ministère de la santé et l'ANSM.

Rappel : Au total **6 cas concernant des bio-valves ont été rapportés depuis le début de l'alerte en 2011. Ces cas impliquaient différentes espèces de mycobactéries** : *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.lentiflavum*, *M.fuerthensis*, *M.wolinskyi*. Un message d'alerte sanitaire rapide (MARS) avait été envoyé en 2015. Les investigations n'avaient pas permis d'identifier des sources de contamination liées à la production industrielle de bio-valves et les CCLIN n'avaient pas identifié de réservoir environnemental ni de défaut pouvant expliquer la contamination per-opérateur.

En 2016, aucun cas n'a été rapporté au CNR.

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

Le CNR-MyRMA et l'InVS avaient en 2015 :

- diffusé cette alerte aux chirurgiens cardiaques, cardiologues, infectiologues et laboratoires de mycobactériologie
- et mené une enquête rétrospective sur les cas possibles à partir (i) du système de signalement externe des infections nosocomiales, (ii) des cas identifiés au CNR-MyRMA durant la période 2010-2015, (iii) du réseau Azay-mycobactéries et (iv) d'un questionnaire CNR-MyRMA-InVS envoyé le 24 juin 2015 aux chirurgiens et microbiologistes des établissements pratiquant des CEC (cf pièce annexe).

L'enquête avait permis d'identifier, **4 cas potentiels d'infection pour la période 2010- 2015 mais en fait deux cas seulement ont été confirmés pour une infection post-CEC à *M. chimaera* survenus en France**. Les deux cas infirmés étaient soit un *M. avium*, soit une personne non opérée. Les souches ont été identifiées par plusieurs méthodes afin de confirmer l'espèce *M.chimaera* (cf nouvelles méthodes diagnostiques).

Les deux cas étaient les suivants :

- o cas n°1 (opéré en Ile de France) patient décédé peu après le diagnostic
- o cas n°2 (opéré en Provence Côte d'azur) patient ayant rechuté après une intervention chirurgicale pour remplacement de prothèse. Le patient est toujours en cours de traitement.

Les souches (une du cas n°1 et deux du cas n°2) et 2 souches témoins **ont été comparées en 2016 par REP-PCR Diversilab** (profils similaires >95%) **et par analyse du génome entier** (GS junior et Illumina). Elles ont été envoyées au centre de référence des mycobactéries en Allemagne (Borstel) pour comparaison aux autres souches européennes. Les résultats détaillés seront disponibles en 2017.

La source commune est probablement les appareils appelés « Heater-coolers » ou générateurs thermiques



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

utilisés pour la CEC. Des souches de *M. chimaera* ont été isolées de nombreux appareils ainsi que dans l'usine de production en Allemagne pour l'Europe. La comparaison de souches isolées chez les patients et dans les appareils a été montrée pour les cas survenus aux USA et en Europe (UK, Allemagne, Suisse).

La commercialisation des générateurs thermiques se poursuivant, les industriels recommandent depuis 2015 de faire une désinfection du circuit des appareils, un changement régulier de l'eau ainsi qu'une recherche régulière des mycobactéries dans l'eau des circuits. Cette recherche n'étant pas standardisée

Nous avons testé **en 2016 la mise en œuvre d'un protocole de recherche de mycobactéries que nous avons mis au point spécifiquement pour les eaux des Heater-cooler**. Globalement, plus de 50% des GT étudiées étaient positifs avec des micro-organismes vivant usuellement dans l'eau tels que *Pseudomonas aeruginosa*, levures, champignons filamenteux. Après décontamination (cétylpyridinium) du prélèvement pour éliminer *P.aeruginosa* et autres microorganismes qui envahissent les cultures, nous avons pu cultiver des mycobactéries des espèces *M.chelonae*, *M.chimaera* ou *M.mucogenicum*.

Un **protocole de recherche des mycobactéries applicable plus largement aux eaux** (eaux de ruissellement, réseaux d'eau potable...) a été mis au point en collaboration avec Eau de Paris afin de standardiser cette recherche. Ce protocole a été testé avec des échantillons artificiels d'eauensemencé avec des quantités croissantes de *M. chimaera* et autres mycobactéries. Les résultats seront disponibles en 2017. Dès validation, ce protocole sera mis à la disposition des laboratoires sur le site du CNR.

2. Rechute ou réinfection à *M.chelonae*

En 2016, nous avons été alertés par des collègues intrigués par 2 cas d'infection cutanée à *M.chelonae* à 4 ans d'intervalle (2012 et 2016) chez un patient insuffisant rénal (Ile de France). La crainte était une persistance de sources environnementales dans l'entourage du patient. Nous avons réalisé le génotypage des souches (phénotype, REP-PCR, champ pulsé et MaldiTof) ce qui a montré des profils non différenciables. Les 2 souches étaient sensibles à la clarithromycine (CMI < 0.25 mg), CMI linézolide 8 et 16 mg/l. Ces éléments ont conforté l'hypothèse d'une rechute et non une réinfection qui aurait alors probablement été causée par des souches un peu différentes étant donné le long intervalle de temps entre les 2 épisodes. Néanmoins, comme cela a déjà été remarqué, il y a peu de variété phénotypique et génotypique chez *M. chelonae*. C'est pourquoi nous avons initié en 2017 des séquençages génomiques par Illumina, et une analyse avec la collaboration du Génoscope.



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

5.1. Information

Le site internet <http://cnrmyctb.free.fr> créé en 2006 est régulièrement mis à jour :

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

Le GBEA de mycobactériologie rédigé par le Groupe AZAY-mycobactéries est accessible par le site.

5.2. Formation

5.2.1. Accueil de stagiaires et missions de formation en 2016

Stagiaires

Le CNR-MyRMA a accueilli, en 2016, **9 stagiaires** pour une durée totale de **16 mois**, **soit une moyenne de 1,3 stagiaires présents tout au long de l'année** :

- Agathe Dalin, « Mesure et comparaison de l'émergence spontanée de mutants résistants au Délamanid chez différentes lignées phylogéniques de *Mycobacterium tuberculosis* », Master 2, Paris Sud, 6 mois
- Corentin Travet, « Fonctionnement d'une animalerie », Stagiaire 1^{ère} année BTA LEGTA Vendôme, 2 mois
- Aurélie GUIGON, "techniques de Biologie Moléculaire pour le diagnostic de *Mycobacterium tuberculosis* et de sa résistance aux anti-tuberculeux", Biologiste, 2 jours
- Marine Sellem, « Etude d'une mutation de GyrA hors de la QRDR dans l'acquisition de la résistance aux quinolones chez *Mycobacterium tuberculosis* », Master 1, Paris 6, 2 mois
- Bastien Hirtz, « Etude de l'impact de mutations hors QRDR de GyrA dans la résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* », stage de BTS 1^{ère} année Paris 1 mois
- Yannick KAMDEM SIMO, technicien, Unité de Mycobactériologie, Centre Institut Pasteur, Yaounde, Cameroun, « étude génétique des souches de tuberculose MDR », 1 mois
- Patricia MAUCOTEL, technicienne, Laboratoire du CH de Tahiti (Dr Levy), 1 mois
- Rozen ESVAN, programme ESCMID Observership, infectiologue, Université de Rome Italie, 1 mois
- Fériel BOUZIANE, Thèse de sciences sur « l'étude génétique des souches de tuberculose MDR », Institut Pasteur d'Alger, Algérie, 2 mois

Missions

Emmanuelle Cambau

- Missions organisées dans le cadre du groupe sur les infections à mycobactéries de l'ESCMID :
 - o Post-Graduate Course sur la tuberculose MDR, Cape Town, January 2016
 - o Post-Graduate Course sur les infections à mycobactéries difficiles à traiter (tuberculose MDR et NTM), Croatie, 2016
 - o Workshop à l'ECCMID 2016, Amsterdam, Avril 2016 sur les infections à mycobactéries non tuberculeuses (NTM)



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

- International Leprosy congress, Pekin, Septembre 2016
- European Medical Agency, Londres, novembre 2016, pour discussion du dossier d'enregistrement européen des nouveaux antituberculeux
- Mission pour l'ECDC-réseau des laboratoires de référence européens (ERLnet Tb), Varsovie, Avril 2016
- Missions pour l'OMS, Programme de lutte contre la lèpre (GLP)
 - WHO meeting " global consultation on antimicrobial resistance in leprosy, Kathmandou, octobre 2016
 - New Delhi (Inde) au siège de l'OMS Asie du Sud Est, Technical advisory group « Leprosy » de l'OMS ; Novembre 2016 : stratégie OMS pour la lutte contre la lèpre, application du programme 2016-2020.
 - Missions avec l'association « Netherland Leprosy Relief » sur un programme de prophylaxie antilèpreuse associée à la détection autour des cas. Amsterdam Novembre 2016
 - Rencontre avec les laboratoires Cepheid, San Francisco, mai 2016, pour discuter d'un test diagnostique de la lèpre.

Laurent Raskine

- Moundou et Ndjamena (Tchad, réseau Esther) : suivi du diagnostic de la tuberculose dans le laboratoire régional de Moundou, mission en septembre 2016
- Tananarive (Madagascar), Fondation Mérieux : diagnostic bactériologie de la tuberculose et de la lèpre, janvier 2016
- Arménie, avril 2016 : mission d'expertise sur le diagnostic de la tuberculose et autres infections bactériennes en conditions extrêmes.

5.2.3. 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 Antibiotique, Université Tours-Poitiers

DIU Antibiotique, 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

DIU de pathologie moléculaire, Université Paris Diderot et Université de Nice

5.3. Activités de conseil

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

Le « **Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile** » organisé par le CNR-MyRMA et dont les activités sont **centré sur les cas de tuberculose MDR, est doté d'une charte** (cf annexes) pour ses réunions qui répondent désormais au label de **Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP), ou « TB-consilium France »**. La liste des participants présents est établie lors de chaque réunion et une bibliographie à jour est mise à la disposition des participants.



Bilan 2016

Au total **159 dossiers ont été discutés** par le Groupe thérapeutique au cours des **11 réunions de 2016, pour 137 patients**, certains patients ayant fait l'objet de plusieurs présentations pour modification de traitement (**Tableau 32**)

Il s'agissait de :

- 41 des 71 cas de tuberculose à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2016. Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 4 réunions,
- 36 des 98 cas de tuberculose à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2015. Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 4 réunions,
- 9 sujets contact de cas MDR pour discussion de prophylaxie,
- 22 cas MDR-XDR de 2014 (dossiers examinés de 1 à 4 fois),
- 3 cas MDR-XDR de 2013,
- 5 cas de patients présents en France mais pour lesquels la souche avait été isolée à l'étranger (Géorgie...) et n'était pas disponible. Pour ces cas, qui ne sont pas comptabilisés dans les 71 cas identifiés à partir des souches reçues au CNR, le RCP ne disposait que des résultats papiers émanant des laboratoires étrangers et des données cliniques.
- 7 cas de tuberculose compliquée non MDR,

En 2016, les participants réguliers aux RCP étaient :

- l'équipe du CNR-MyrMA,
- 3 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Damien Le Dû, Dhiba Marigot Outtandy),
- 2 pédiatres de l'hôpital Trousseau (Katarina Chadelat, Guillaume Thouvenin),
- 1 pneumologue de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Bertrand Dautzenberg Pitié-Salpêtrière),
- 1 membre du SAMU social de Paris (Bénédicte Rivoire)
- 1 infectiologue de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Marie Jaspard)
- 1 spécialiste des dosages antibiotiques de l'hôpital Saint-Joseph (Najoua el Helali)

Tendances évolutives 2006-2016

L'activité du « Groupe thérapeutique », a augmenté de 50% de 2009 à 2011, a doublé entre 2011 et 2012, a augmenté de 30% en 2013 et s'est stabilisée depuis 2014 comme le montre le Tableau 32.

Tableau 32 : Activités de conseil assurées par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » animé par le CNR-MyrMA de 2006 à 2016

	N réunions de travail	N dossiers examinés	Types de dossiers
2006	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (dont 1 femme enceinte)
2007	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (dont 1 enfant 18 mois) - 3 prophylaxies contacts MDR
2008	6	44	- 22 cas MDR 2008 - 19 cas MDR 2007 (suivi) - 3 prophylaxies contacts MDR
2009	8	46	- 20 cas MDR 2009 - 18 cas MDR 2008 (suivi) - 8 prophylaxies contacts MDR
2010	9	64	- 22 cas MDR 2010 - 33 cas MDR 2008-09 (suivi) - 7 cas tuberculose compliquées non MDR - 1 prophylaxie contacts MDR - 1 mycobactériose
2011	11	70	- 27 cas MDR 2011 - 40 cas MDR 2009-10 (suivi) - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
2012	11	148	Les 148 dossiers examinés correspondent à 83 patients :



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

			<ul style="list-style-type: none">- 48 cas MDR-XDR 2012 (dossiers examinés 1 à 5 fois)- 21 cas MDR 2011 (suivi)- 4 cas MDR 2010 (suivi)- 7 prophylaxies contacts MDR- 3 cas tuberculose compliquées non MDR
2013	14	193	Les 193 dossiers examinés correspondent à 121 patients : <ul style="list-style-type: none">- 47 cas MDR-XDR 2013 (dossiers examinés 1 à 4 fois)- 49 cas MDR 2012- 2 cas MDR 2011- 5 prophylaxies contacts MDR- 18 cas tuberculoses compliquées non MDR
2014	11	174	Les 174 dossiers examinés correspondent à 113 patients : <ul style="list-style-type: none">- 54 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés 1 à 4 fois)- 27 cas MDR-XDR 2013- 13 cas MDR-XDR 2012- 3 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France- 6 prophylaxies contacts MDR- 7 cas tuberculoses compliquées non MDR- 3 cas de mycobactérioses
2015	11	160	Les 160 dossiers examinés correspondent à 112 patients : <ul style="list-style-type: none">- 51 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés 1 à 4 fois)- 40 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 à 4 fois)- 3 cas MDR-XDR 2013- 10 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France- 4 prophylaxies contacts MDR- 3 cas tuberculoses compliquées non MDR- 1 cas de mycobactériose
2016	11	159	Les 159 dossiers examinés correspondent à 121 patients : <ul style="list-style-type: none">- 41 cas MDR-XDR 2016 (dossiers examinés 1 à 4 fois)- 36 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés 1 à 4 fois)- 22 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 à 2 fois)- 3 cas MDR-XDR 2013 (dossiers examinés de 1 à 2 fois)- 2 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France (dossiers examinés 1 à 4 fois)- 9 prophylaxies contacts MDR- 7 cas tuberculoses compliquées non MDR



5.3.2. Activités de « conseil direct» (hors RCP) pour la tuberculose

Des avis ont été donnés en dehors des réunions plénières de RCP, directement lors de **plus de 1000 appels ou e-mails en 2016**. La durée totale de ces échanges correspond à **1 mois d'équivalent temps plein de médecin**. Les thèmes de ces avis sont présentés dans la **Figure 9**.

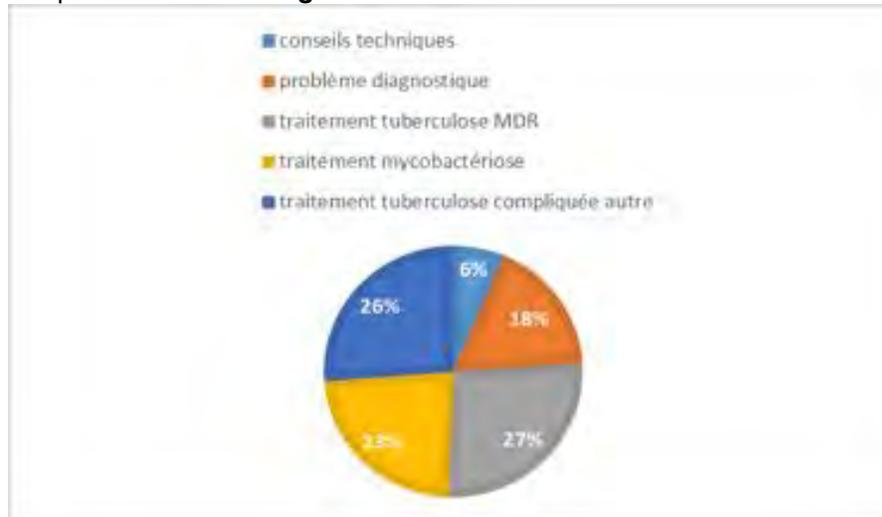


Figure 9 : Proportions d'avis « directs » donnés par le CNR-MyRMA en 2016, par téléphone ou par mail, selon le thème abordé.

Au total, que ce soit au travers des réunions plénières des RCP ou de contacts téléphoniques directs, les 4/5 des cas de tuberculose MDR-XDR identifiés en 2016 ont faits l'objet de conseils thérapeutiques par la CNR-MyRMA.

5.3.3. Conseils pour la prise en charge des infections à mycobactéries non tuberculeuses et des cas de lèpre

L'activité de conseil en matière de mycobactérioses est menée en deux temps :

- **lors de la réception de la souche**, afin (i) de s'assurer qu'il s'agit d'une infection et non d'une contamination, (ii) d'identifier les correspondants microbiologiste et clinicien, (iii) de préciser les circonstances de survenue de l'infection (communautaire ou liée aux soins) et (iv) d'apprécier le degré d'urgence de la prise en charge thérapeutique
- **lors du rendu des résultats** de l'identification de la bactérie et des tests de sensibilité, afin de discuter avec les correspondants du traitement et d'éventuelles autres actions (chirurgie, arrêt des immunodépresseurs, ablation de matériel infecté, etc....).

Le CNR-MyRMA assure aussi des activités de conseil pour les suspicions de **lèpre et d'infection à *M.ulcerans* (ulcère de Buruli)** : conditions de prélèvement, diagnostic, traitement et prise en charge.

5.3.4. Conseil et expertises auprès des autorités sanitaires, médicales et scientifiques nationales et internationales

Autorités nationales

InVS et ANSM

- Emmanuelle Cambau, Faiza Mougari, Nicolas Véziris, Vincent Jarlier et Laurent Raskine ont participé, avec l'institut de Veille Sanitaire, le Ministère de la santé et l'ANSM, aux différentes activités menées suite à l'alerte



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

européenne sur les infections post-circulation extra-corporelle (CEC) à *M. chimaera* (cf détails section 4 « Alertes ») et au suivi des signalements d'endocardites à mycobactéries non tuberculeuses (avril 2016, novembre 2016, nombreuses réunions téléphoniques).

- Emmanuelle Cambau, Nicolas Véziris, Vincent Jarlier, Jérôme Robert, Alexandra Aubry et Laurent Raskine ont participé en septembre 2016 à l'Institut de Veille Sanitaire (Alexandra Mailles, Jean-Paul Guthmann), avec Maria Laura Boschiroli (AFFSA) à une réunion de travail sur la surveillance de la tuberculose à *M. bovis*.

Mutuelle de Santé Agricole (MSA)

- Laurent Raskine a participé aux travaux de la Mutuelle de Santé Agricole (MSA) sur un Protocole de surveillance des professionnels exposés à la tuberculose bovine (réunion du 15 septembre 2016).

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

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

- Wladimir Sougakoff et Emmanuelle Cambau ont organisé avec Patrice Debré (conseiller scientifique de ITMO-I3M) un symposium « NGS for TB : applications et perspectives en diagnostic » dans le cadre de l'Action coordonnée tuberculose (INSERM-IMMI) qui s'est tenue le 24 juin 2016 au siège de l'INSERM à Paris. L'objectif de la réunion était de permettre un échange inter-équipe sur le développement du séquençage complet des génomes mycobactériens appliqué au diagnostic et à la surveillance de la tuberculose.

- Emmanuelle Cambau a organisé avec Alain Baulard (Institut Pasteur de Lille) un symposium sur la recherche de nouveaux antituberculeux (avril 2016, Paris, siège de l'INSERM).

Autorités internationale

OMS

- Emmanuelle Cambau est membre expert du « Réseau OMS de surveillance de la résistance secondaire aux antilépoux » depuis 2008 et du « Technical Advisory Group » chargé d'élaborer le programme de lutte mondiale contre la lèpre, depuis 2013. En 2016, ce groupe a publié le plan stratégique de lutte contre la lèpre.

- Emmanuelle Cambau a été nommée en 2016 responsable du groupe « Thérapeutique de la lèpre » pour la mandature 2016-2020.

- Emmanuelle Cambau a participé en novembre 2016 à New Delhi à une réunion « Technical advisory group » destinée à mettre en place le projet stratégique de l'OMS sur la lèpre pour 2016-2020.

- Emmanuelle Cambau a organisé en 2016 avec le « Good laboratory practice » (GLP) de l'OMS la réunion sur le suivi de la résistance aux antilépoux qui s'est tenue à Katmandou en octobre 2016.

- Nicolas Véziris fait partie des experts ERS/OMS pour les conseils de prise en charge des TB MDR en Europe (WHO consilium MDR-TB).

- Nicolas Véziris fait partie des experts ERS/OMS pour les conseils de prise en charge des TB MDR en Europe (WHO consilium MDR-TB).

- Jérôme Robert fait partie des investigateurs et membre expert de l'essai multicentrique (coordonné par l'OMS sur le traitement oral de l'ulcère de Buruli en Afrique de l'ouest (Ghana, Bénin).

ECDC

- Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier sont membres du réseau européen des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) depuis sa création en 2010 sous l'égide de l'ECDC. Le contrat du réseau ERLN-TB a été renouvelé par l'ECDC pour la période 2014-2018.

- Vincent Jarlier et Emmanuelle Cambau ont participé au 7ème workshop de ERLN-TB en avril 2016 à Varsovie (Pologne).

- Emmanuelle Cambau a participé en 2016 au groupe de travail animé par l'ECDC pour répondre à l'alerte européenne sur les infections post-CEC à *M. chimaera*. Deux réunions téléphoniques ont eu lieu en 2016 pour le suivi de l'enquête épidémiologique et microbiologique.

- Vincent Jarlier a été élu par les membres de ERLN-TB comme membre du TB-Disease Network Coordination Committee (TB-DNCC) en 2016.



EMA - EUCAST

- Emmanuelle Cambau est la correspondante de l'**EMA** (European Agency for Medicine) pour l'expertise bactériologique des nouveaux antituberculeux et la détermination des concentrations critiques (en lien avec l'EUCAST).
- Emmanuelle Cambau est membre expert de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) pour la mise sur le marché et les méthodes de tests de sensibilité concernant les nouveaux antituberculeux. Elle a été nommée en 2016, responsable du sous-comité pour les mycobactéries (EUCAST subcommittee on antimycobacterial susceptibility testing). Les objectifs sont (1) de mettre en place une méthode standardisée de détermination des CMI, (2) de l'adapter aux principaux antituberculeux y compris les nouvelles molécules (bédaquiline, délamanide...) et (3) mettre au point les tests phénotypiques de sensibilité et génotypique de détection de la résistance.

ESCMID

- Emmanuelle Cambau est Présidente du groupe « European Study Group for Mycobacteria (ESGMYC) », Groupe qu'elle a créé en 2010 au sein de l'European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (ESCMID).
- La réunion plénière annuelle de l'ESGMYC s'est tenue durant le congrès de l'ECCMID à Amsterdam en avril 2016 pour définir les actions à venir. Un « ESCMID postgraduate education course » sur le thème « Difficulty to treat mycobacterial infections » a été organisé en septembre 2016 en partenariat avec la société de microbiologie de Croatie.
- Emmanuelle Cambau est co-organisatrice du "Guideline committee for diagnosis and treatment of respiratory infections due to nontuberculous mycobacteria" qui associe à l'ESCMID trois autres sociétés savantes internationales (American Thoracic Society, **ATS** ; European Respiratory Society, **ERS** ; Infectious Diseases Society of America, **IDSA**) pour rédiger des recommandations pour le traitement des infections respiratoires à mycobactéries non tuberculeuses. Les réunions de travail ont eu lieu en mai 2016 à San Francisco (dans le cadre du congrès de l'ATS).

ISTC

- Emmanuelle Cambau est membre du comité scientifique des projets européens venant des instituts de recherche affiliés à l'International science and technology center (ISTC) des pays de l'ex URSS.



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

6.1. Travaux de recherche 2016 ou en cours

6.1.1. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries

Comparaison de l'activité de la lévofloxacine et de la moxifloxacine dans le modèle murin de tuberculose

Le principal facteur de mauvais pronostic des tuberculoses à bacilles ultrarésistants (R à INH-RIF + R fluoroquinolones et aminosides, TB-XDR) est la résistance aux fluoroquinolones. Nous avons montré dans nos précédents travaux que certaines mutations de l'ADN gyrase conféraient une résistance nette à l'ofloxacine mais un bas niveau de résistance à la moxifloxacine, qui garde ainsi une activité résiduelle in vivo. Compte-tenu de l'allongement du QT en cas de prise de moxifloxacine, il est recommandé de la remplacer par de la lévofloxacine en cas d'association avec les nouveaux antituberculeux tels que le délamanide ou la bédaquiline. L'efficacité d'une telle stratégie n'a toutefois pas été évaluée en cas de bas niveau de résistance aux fluoroquinolones.

Nos résultats ont montré que la lévofloxacine à forte posologie (1000 mg/j) apparaît moins active que la moxifloxacine à forte posologie (800 mg/j) contre des souches de *M. tuberculosis* de bas niveau de résistance aux fluoroquinolones. **La moxifloxacine doit rester la FQ de choix pour le traitement des TB-XDR.**

Ces résultats sont acceptés pour publication dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

6.1.2. Evaluation du mécanisme d'action de dérivés de fluoroquinolones

Nous avons initié un projet de synthèse de nouvelles fluoroquinolones avec l'équipe de G. Anquetin (Faculté des Sciences, Université Paris 5), projet guidé par les données de relation structure-activité obtenues à travers les travaux publiés, en particulier les nôtres, sur l'ADN gyrase des mycobactéries. Ce projet avait permis d'obtenir de déposer un brevet européen (n°EP 14 173 040.8) le 18 juin 2014, et un brevet international (n° PCT/EP2015/063752) du 18 juin 2015. Grâce à un financement d'un programme de maturation par la SATT Lutech, nous avons pu poursuivre l'évaluation de ces composés actifs dans un modèle murin de tuberculose et de rechercher le mode d'action de ces composés, qui ne semble pas lié à l'inhibition de l'ADN gyrase bien que ces molécules soient des dérivés de fluoroquinolones.

Pour des raisons de confidentialité, les résultats concernant ces molécules ne seront pas publiés pour le moment.

6.1.3. Agents antimycobactériens : mécanismes d'action et de résistance

Mécanismes de résistance acquise aux aminosides/peptide cyclique (APC) dans les souches cliniques multirésistantes de M. tuberculosis

Les aminosides, amikacine (AMK) et kanamycine (KAN) et le peptide cyclique capréomycine (CAP), sont, avec les fluoroquinolones, des médicaments de 2^{ème} ligne clés pour le traitement de la tuberculose multirésistante (MDR-TB). Ils agissent en se liant à l'ARNr 16S et en inhibant la synthèse protéique. Les mutations en positions 1401, 1402 et 1484 dans le gène codant l'ARNr 16S (*rrs*) sont déjà connues pour causer la résistance croisée à ces 3 aminosides/peptide cyclique (APC). Des mutations dans le gène *tlyA*, qui code une putative méthyltransférase



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

modifiant l'ARNr, et dans la région promotrice du gène *eis* (pro *eis*), qui code une aminoside acétyltransférase inactivant certains aminosides, pourraient être responsable de la résistance (R) à CAP et à KAN, respectivement.

Nous avons mesuré la sensibilité aux APC par méthode phénotypique (méthode des proportions sur milieu de Lowenstein-Jensen) et avons entrepris l'analyse génotypique par séquençages des gènes *rrs*, promoteur-*eis* et *tlyA* de 206 souches cliniques de *M. tuberculosis* MDR reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2014 : 153 sensibles à AMK/KAN/CAP, 23 R-AMK/KAN/CAP, 22 monoR-KAN, 3 R-AMK/KAN, 2 R-CAP/KAN et 3 monoR-CAP.

Ainsi, nous avons montré que la discordance entre les résultats génotypiques et phénotypiques étaient expliqués par (i) des CMI proches de la concentration critique utilisée pour l'antibiogramme phénotypique (concerne 15% des souches), (ii) l'hétéro-résistance (15% des souches), et (iii) des mécanismes de résistance non encore élucidés (13% des souches).

Ces résultats ont été publiés dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy début 2017

Mécanisme de résistance acquise aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* : mutations compensatoires

Les fluoroquinolones (FQ) sont des médicaments de 2^{ème} ligne clés pour le traitement de la TB-MDR. La résistance aux FQ chez *M. tuberculosis* est principalement due à des mutations dans l'ADN gyrase (tétramère GyrA₂GyrB₂), cible unique des FQ chez cette espèce. La mesure de la sensibilité aux FQ (MSF) est effectuée par des méthodes phénotypiques, mais les tests génotypiques sont de plus en plus utilisés.

Nous avons étudié deux souches cliniques MDR portant une mutation dans *gyrA* habituellement impliquée dans la résistance aux FQ (A90E ou D94N) mais qui se sont étonnamment révélées sensibles à FQ (CMI de l'ofloxacine \leq 2 mg / L). Nous avons montré que les **mutations T80A et A90G également présentes dans ces souches restauraient la sensibilité aux FQ lorsqu'elles sont associées à une mutation impliquée dans la résistance de haut niveau aux FQ.**

Ces résultats ont été publiés dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy en 2016

Description des premières souches cliniques de TB-MDR résistantes à la bédaquiline en France

La bédaquiline (BDQ) est un nouvel antituberculeux très actif pour le traitement des tuberculoses multirésistantes et ultrarésistantes (TB-MDR et -XDR). Bien qu'il n'ait été introduit que récemment, des souches résistantes ont déjà été décrites. Le mécanisme de résistance décrit à ce jour dans les souches cliniques correspond à des mutations dans le gène *rv0678* codant pour un répresseur de la pompe d'efflux MmpL5 responsables d'une résistance croisée à la clofazimine, tandis que les souches résistantes sélectionnées in vitro ont préférentiellement des mutations dans la cible (ATP synthase (*atpE*)). Notre objectif était de dépister et d'analyser les cas de résistance à la bédaquiline en France.

Sur 209 souches multirésistantes, 4 souches résistantes à la BDQ ont été identifiées (2%) sur une période de 2 ans. Parmi ces souches, 3 avaient une mutation dans le gène *Rv0678* et aucune dans le gène *atpE*. Deux ont été isolées chez des patients n'ayant reçu ni BDQ, ni clofazimine, et pour lesquels aucun facteur de risque de résistance n'a pu être mis en évidence (= résistance primaire) ; l'une de ces 2 souches n'avait aucune mutation dans les gènes *rv0678* et *atpE*. Les 2 autres souches ont été isolées chez des patients qui avaient déjà été traités avec de la BDQ, associée à seulement un ou deux antituberculeux de seconde ligne, principalement du fait d'intolérances médicamenteuses (= résistance secondaire).

L'existence de cas de résistance primaire à la BDQ rend indispensable la réalisation de test de sensibilité (phénotypique +/- génotypique) avant l'utilisation de cette molécule. Les cas de résistance secondaire à la BDQ soulignent que tous les antituberculeux de seconde ligne ne sont pas équivalents ; aussi il est essentiel de combiner systématiquement la BDQ avec au moins un médicament de seconde ligne parmi les plus efficaces pour toute la durée du traitement.

Ces résultats ont été publiés dans l'European Respiratory Journal en 2016



Etude de la résistance acquise à la clarithromycine chez des mutants *in vitro* de *Mycobacterium abscessus*

Afin d'évaluer si les échecs rapportés lors des traitements d'infections à *M.abscessus* par la clarithromycine pourraient être préférentiellement liés soit à la production naturelle d'ARNr méthyltransférase soit à la sélection de mutants de l'ARNr 23S, nous avons mimé les circonstances d'acquisition de résistance à la clarithromycine sous traitement en fonction des sous-espèces et de sequevars de *erm(41)* décrits dans la section 1.1. « Nouvelles techniques ». La méthode consistait à reproduire *in vitro* une pression de sélection par la clarithromycine sur une souche parentale de *M.abscessus* sensu stricto sequevar *erm(41)* C28, *M.abscessus* sensu stricto sequevar *erm(41)* T28, *M.abscessus* subsp. *bolletii* et *M.abscessus* subsp. *massiliense*.

Nous avons comparés les caractéristiques des mutants ainsi sélectionnées par séquençage (a) du gène *rrl*, (b) des gènes *rpIV* et *rpID* codant les protéines ribosomales L22 et L4, (c) de la région promotrice du gène *erm(41)* et (d) du gène *whiB*. Nous avons caractérisé phénotypiquement la résistance à la clarithromycine et évalué d'éventuelles résistances croisées aux autres antibiotiques potentiellement actifs, en mesurant les CMI en milieu solide (Steers et Etest) et en milieu liquide.

Pour les mutants obtenus à partir des sequevars non producteurs d'ARNr méthyltransférase et donc naturellement sensibles à la clarithromycine (*M.abscessus* sensu stricto sequevar *erm(41)* C28 et *M.abscessus* subsp. *massiliense*) tous les mutants sélectionnés portaient une mutation dans la sous unité 50S du ribosome : 100% (26/26) et 97,5% (39/40), respectivement, une mutation du gène *rrl* en position 2058 (A2058C, A2058G, A2058T) ou 2059 (A2059C, A2059G), et phénotypiquement un haut niveau de résistance à la clarithromycine. Le dernier mutant de *M.abscessus* subsp. *massiliense* portait une insertion répétée de 18 paires de bases dans le gène *rpIV* codant L22, mécanisme qui n'avait jamais été décrit chez *M.abscessus*. Ceci montre que lorsque les souches n'ont pas d'ARNr méthyltransférase fonctionnelle, le meilleur mécanisme pour acquérir la résistance à la clarithromycine est la survenue d'une mutation ribosomale.

Pour les mutants obtenus à partir de *M.abscessus* sensu stricto sequevar *erm(41)* T28 et *M.abscessus* subsp. *bolletii*, qui produisent une méthyltransférase fonctionnelle inductible, une mutation du gène *rrl* en 2058 ou 2059 n'a été trouvée que chez respectivement 20% (4/20) et 32.5% (13/40) des bactéries obtenues pour ces 2 espèces, aux positions 2058 (A2058C, A2058G) ou 2059 (A2059C, A2059G).

Nos résultats ont montré que l'acquisition de résistance à la clarithromycine est toujours médiée par des mutations de la sous-unité 50S du ribosome pour *M.abscessus* sensu stricto sequevar *erm(41)* C28 et *M.abscessus* subsp. *massiliense* alors que ce mécanisme est beaucoup moins fréquent pour *M.abscessus* sensu stricto sequevar *erm(41)* T28 et *M.abscessus* subsp. *bolletii*, pour lesquels d'autres mécanismes peuvent être responsables de l'échec de traitement, en particulier une simple induction de la production de leur méthyltransférase naturelle. Ces mécanismes sont en cours d'étude par séquençage du génome entier.

Ces résultats sont soumis pour publication à Antimicrob Agents Chemother

6.1.4. Etudes génotypiques

Etude des souches MDR de M.tuberculosis par séquençage du génome entier (WGS)

Suite au programme d'étude des souches de *M.tuberculosis* MDR de la lignée Beijing par séquençage « génome entier » (WGS) initié progressivement en 2014, nous avons en 2016 analysé 74 génomes de souches cliniques MDR de *M.tuberculosis* (Figure 10).

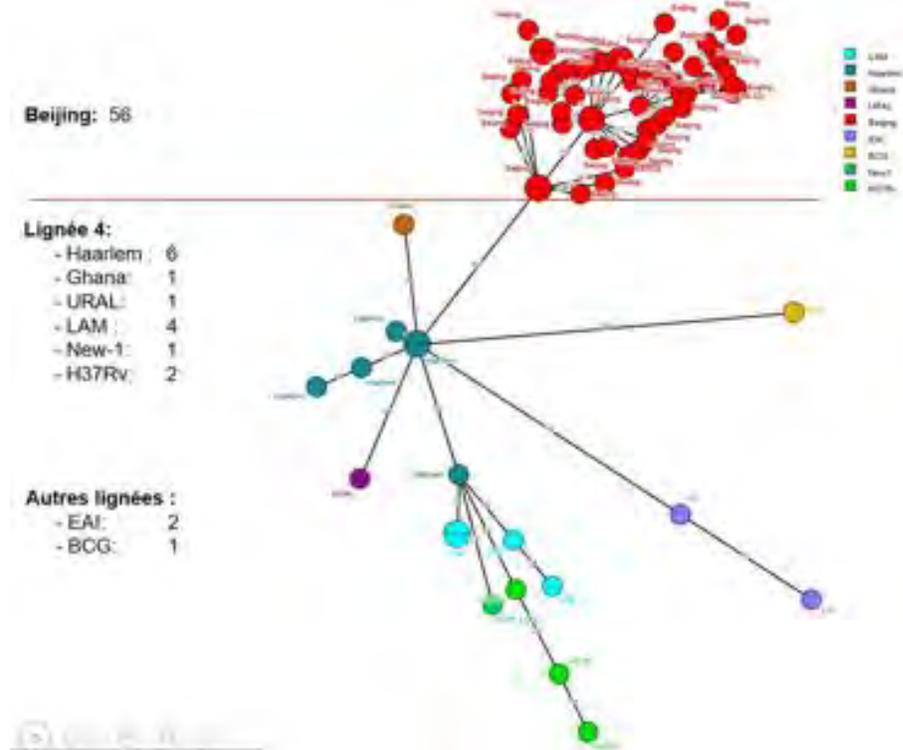


Figure 10. Minimum spanning tree représentant les distances évolutives de 74 génomes de *M. tuberculosis* (56 souches Beijing, 15 souches de la lignée 4, 2 souches EAI et une souche BCG). Les longueurs des branches sont proportionnelles aux nombres de mutations (SNP) détectées entre les souches.

Résultats pour les souches Beijing

En 2014, nous avons comparé les génomes de 27 souches MDR de *M.tuberculosis* Beijing reçues par le CNR-MyRMA au génome de la souche de référence H37Rv. **Ces souches**, qui pourraient avoir un fort potentiel de transmission dans la population européenne (ECDC surveillance report « molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA », <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/multidrug-resistant-tuberculosis-molecular-typing-surveillance.pdf>), **sont regroupées en 2 clusters majoritaires** initialement appelés cluster 2 (CL2, caractérisé par un code MLVA-MtbC15-9 de type 94-32) et cluster 5 (CL5, caractérisé par un code MLVA-MtbC15-9 de type 100-32). Ces souches **proviennent essentiellement de patients originaires des pays de l'ex-URSS** (Géorgie, Tchétchénie, Russie, Arménie, Ukraine, Azerbaïdjan, Moldavie). Nous avons aussi inclus, à titre de témoins des souches MDR Beijing non reliées aux clusters CL2 ou CL5 (souches dites « non clusterisées » ou « nc »), isolées de patients nés en Russie, en Géorgie, en Moldavie, en Inde et au Tibet.

L'analyse par WGS des 56 génomes Beijing déterminés en 2016 (a) a confirmé l'existence des 2 larges clusters parmi les souches MDR Beijing, mais (b) **a permis de subdiviser un de ces clusters en branches distinctes** :

- **Souches du cluster 5 (CL5) de type 100-32 (Figure 11):**



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

VNTR 24 loci pour les souches Beijing, et (ii) par une propagation active dans les pays de l'ex-URSS de souches MDR Beijing apparentées à la souche hyper-virulent W148 (CL5) et à la souche CCDC5079 (CL2). Ces 2 clusters ont des origines différentes (Russie et Chine respectivement), le cluster CL2 étant lui-même constitué de 4 sous-groupes de souches relativement éloignées (60 SNPs).

On note cependant au sein du cluster CL2 que les **3 souches du sous-groupe « gris » se différencient deux à deux par un nombre très faible de SNP au niveau de leurs génomes complets** (respectivement 3 et 4 SNP) (**Figure 13**). Ces résultats sont en faveur de l'existence de contacts directs entre patients pour les 3 cas. L'analyse des profils de mutations impliquées dans la résistance aux antituberculeux (**tableau 33**) confirme cette hypothèse pour les patients DOL et GUR qui présentent des profils de mutations parfaitement identiques. Les profils des cas NAM et DOL sont très proches mais varient au niveau de 2 gènes de résistance (*pncA* et *rrs*), ce qui suggère que ces patients sont proches dans la chaîne de transmission mais qu'il n'y a pas eu de contact direct entre eux.

Tableau 33. Mutations identifiées au niveau des gènes de résistance aux anti-tuberculeux pour 3 souches Beijing dont les génomes ne diffèrent que par 4 (NAM et DOL) et 3 SNP (DOL et GUR)

Identifiant des souches	pays de naissance	<i>katG315</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>pncA</i>	<i>rrs</i>	<i>embB</i> 306	<i>ethA</i>
NAM (2012)	Russie	S315T	-15c>t	S531L	D94G	wt	del405-C	S	wt	wt
DOL (2014)	Géorgie	S315T	-15c>t	S531L	D94G		H71R	A1401G	wt	wt
GUR (2012)	Géorgie	S315T	-15c>t	S531L	D94G	wt	H71R	A1401G	wt	wt

Résultats pour les souches Haarlem

Parmi les 5 souches Haarlem analysées par WGS, 3 présentaient au niveau des gènes de résistance des profils de mutations identiques (**Tableau 34**). Ces 3 souches ont été isolées de 3 patients appartenant à une chaîne de transmission clairement identifiée en Corse par les données épidémiologiques de terrain.

Tableau 34. Mutations identifiées au niveau des gènes de résistance aux anti-tuberculeux pour 3 souches Haarlem présentant des génomes quasiment identiques

Identifiant des souches	KatG315	RpoB	Pnca	EmbB	EthA
60216	S315T	S531L	A146T	M306I	del 1242t
64472	S315T	S531L	A146T	M306I	del 1242t
25790	S315T	S531L	A146T	M306I	del 1242t

L'analyse WGS indique que les 3 souches Haarlem présentent, comme attendu, des génomes quasiment identiques, avec 1 seul SNP détecté entre les souches 60216 et 64472, et aucun SNP entre 60216 et 25790 (**Figure 13**).

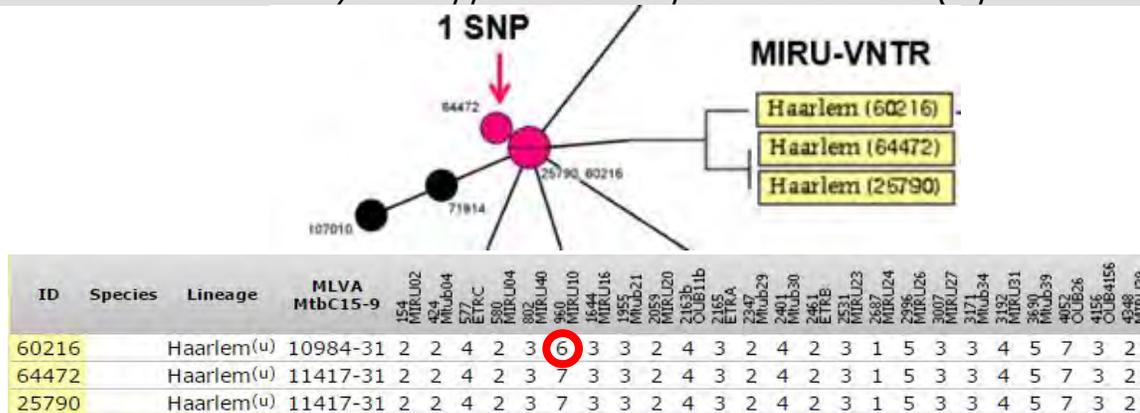


Figure 13. Haut : minimum spanning tree calculé à partir du WGS pour 5 souches Haarlem. Les 3 souches étudiées ci-dessus (cf. texte) et qui ont des génomes quasiment identiques sont indiquées en rose (2 cercles très proches). Bas : MIRU-VNTR des 3 souches analysées par WGS.

Il est intéressant de noter que les souches 25790 et 60216, qui présentent 100% d'identité au niveau de leurs génomes, ont des MIRU-VNTR qui diffèrent au niveau d'un locus (locus 960-MIRU10 sur la Figure XX). Cette différence entre les codes MIRU pouvait suggérer que la distance entre les 2 souches dans la chaîne de transmission observée en Corse était plus importante. L'analyse WGS suggère au contraire une transmission directe entre les 2 patients concernés, la différence dans le code MIRU pouvant être expliquée par une variabilité plus élevée des loci MIRU au moment de l'événement de transmission/infection.

Ces résultats montrent l'intérêt potentiel du séquençage complet des génomes des souches de *M.tuberculosis* MDR en tant qu'outil de typage moléculaire à très haute résolution, qui devrait contribuer à mieux comprendre les dynamiques d'émergence d'une partie des cas de tuberculose MDR observés en France, ainsi que les caractéristiques moléculaires des souches qui y sont associées.

Ces résultats, qui nous ont amené à poursuivre l'implantation en routine de l'approche de séquençage génome entier au CNR-MyRMA (cf section 1), ont été présentés à la 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (« Apports et limites du séquençage des génomes de *Mycobacterium tuberculosis* », RICAI, Paris, décembre 2016).

Ref. Wlodarska M, Johnston JC, Gardy JL, Tang P. A microbiological revolution meets an ancient disease: improving the management of tuberculosis with genomics. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Apr;28(2):523-39.

6.2 Publications et communications

Publications Internationales (*en tant que collaborateur(s) à des études multicentriques)

1. N. Veziris, C. Bernard, L. Guglielmetti, D. Le Dù, D. Marigot-Outtandy, M. Jaspard, E. Caumes, I. Lerat, C. Rioux, Y. Yazdanpanah, A. Tiotiu, N. Lemaitre, F. Brossier, V. Jarlier, J. Robert, W. Sougakoff, A. Aubry. 2016. Rapid emergence of *Mycobacterium tuberculosis* bedaquiline resistance: lessons not to repeat past errors. *European Respiratory Journal*: (in press).
2. Bernard C, Aubry A, Chauffour A, Brossier F, Robert J, Veziris N. 2016. In vivo *Mycobacterium tuberculosis* fluoroquinolone resistance emergence: a complex phenomenon poorly detected by current diagnostic tests. *J Antimicrob Chemother* 71:3465–3472.
3. Brossier F, Boudinet M, Jarlier V, Petrella S, Sougakoff W. 2016. Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 100:15–24.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

4. Brossier F, Cambau E, Tessier E, Jarlier V, Sougakoff W. 2016. The in vitro mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those in vivo in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 101:144–145.
5. Brossier F, Guindo D, Pham A, Reibel F, Sougakoff W, Veziris N, Aubry A, French National Reference Center for Mycobacteria (Members of the French National Reference Center for Mycobacteria: Christine Bernard, Emmanuelle Cambau, Vincent Jarlier, Faiza Mougari, Laurent Raskine, Jérôme Robert). 2016. Performance of the New V2.0 of the GenoType MTBDRsl Test for the Detection of Resistance to Second-Line Drugs in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *J Clin Microbiol* 54:1573–1580.
6. Brossier F, Pham A, Bernard C, Aubry A, Jarlier V, Veziris N, Sougakoff W, CNR-MyRMA. 2016. Molecular investigation of resistance to second line injectable drugs in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrob Agents Chemother* Nov 28:pii: AAC.01299-16.
7. Chauffour A, Robert J, Veziris N, Aubry A, Jarlier V. 2016. Sterilizing Activity of Fully Oral Intermittent Regimens against *Mycobacterium Ulcerans* Infection in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0005066.
8. Guglielmetti L, Le Dû D, Veziris N, Caumes E, Marigot-Outtandy D, Yazdanpanah Y, Robert J, Fréchet-Jachym M, MDR-TB Management Group of the French National Reference Center for Mycobacteria and the Physicians of the French MDR-TB Cohort. 2016. Is bedaquiline as effective as fluoroquinolones in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis? *Eur Respir J* 48:582–585.
9. Pantel A, Petrella S, Veziris N, Matrat S, Bouige A, Ferrand H, Sougakoff W, Mayer C, Aubry A. 2016. Description of compensatory *gyrA* mutations restoring fluoroquinolone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 71:2428–2431.
10. Chazel M, Marchandin H, Keck N, Terru D, Carrière C, Ponsoda M, Jacomo V, Panteix G, Bouzinbi N, Bañuls A-L, Choisy M, Solassol J, Aubry A, Godreuil S. 2016. Evaluation of the SLOMYCO Sensititre® panel for testing the antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium marinum* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 15:doi: 10.1186/s12941-016-0145-1.
11. Crabol Y, Catherinot E, Veziris N, Jullien V, Lortholary O. 2016. Rifabutin: where do we stand in 2016? *J Antimicrob Chemother* 71:1759–1771.
12. Fox GJ, Benedetti A, Mitnick CD, Pai M, Menzies D, Collaborative Group for Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB. 2016. Propensity Score-Based Approaches to Confounding by Indication in Individual Patient Data Meta-Analysis: Non-Standardized Treatment for Multidrug Resistant Tuberculosis. *PLoS ONE* 11:e0151724.
13. Fox GJ, Mitnick CD, Benedetti A, Chan ED, Becerra M, Chiang C-Y, Keshavjee S, Koh W-J, Shiraishi Y, Viiklepp P, Yim J-J, Pasvol G, Robert J, Shim TS, Shin SS, Menzies D, Collaborative Group for Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB. 2016. Surgery as an Adjunctive Treatment for Multidrug-Resistant Tuberculosis: An Individual Patient Data Metaanalysis. *Clin Infect Dis* 62:887–895.
14. Henry B, Revest M, Dournon N, Epelboin L, Mellon G, Bellaud G, Mordant P, Le Dû D, Véziris N, Bernard C, Morel S, Jauréguiberry S, Michelet C, Bricaire F, Tattevin P, Caumes É. 2016. Preliminary Favorable Outcome for Medically and Surgically Managed Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, France, 2009-2014. *Emerging Infect Dis* 22:518–521.
15. Lachâtre M, Rioux C, Dû DL, Fréchet-Jachym M, Veziris N, Bouvet E, Yazdanpanah Y. 2016. Bedaquiline plus delamanid for XDR tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 16:294.
16. Lange C, Duarte R, Fréchet-Jachym M, Guenther G, Guglielmetti L, Olaru ID, Oliveira O, Rumetshofer R, Veziris N, van Leth F, European MDR-TB database collaboration *. 2016. Limited Benefit of the New Shorter Multidrug-Resistant Tuberculosis Regimen in Europe. *Am J Respir Crit Care Med* 194:1029–1031.
17. Lortholary O, Roussillon C, Boucherie C, Padoin C, Chaix M-L, Breton G, Rami A, Veziris N, Patey O, Caumes E, May T, Molina J-M, Robert J, Tod M, Fagard C, Chêne G, ANRS 129 BKVIR Trial Group. 2016. Tenofovir DF/emtricitabine and efavirenz combination therapy for HIV infection in patients treated for tuberculosis: the ANRS 129 BKVIR trial. *J Antimicrob Chemother* 71:783–793.*
18. Mougari F, Amarsy R, Veziris N, Bastian S, Brossier F, Berçot B, Raskine L, Cambau E. 2016. Standardized interpretation of antibiotic susceptibility testing and resistance genotyping for *Mycobacterium abscessus* with regard to subspecies and *erm41* sequevar. *J Antimicrob Chemother* 71:2208–12.
19. Mougari F, Bouziane F, Crockett F, Rachid NR, Chau F, Veziris N, Sapriel G, Raskine L, Cambau E. 2016. Selection of resistance to clarithromycin with regard to the subspecies in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob*



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Agents Chemother Oct 31;pii: AAC.00943-16.

20. Mougari F, Guglielmetti L, Raskine L, Sermet-Gaudelus I, Veziris N, Cambau E. 2016. Infections caused by Mycobacterium abscessus: epidemiology, diagnostic tools and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 14:1139–1154.
21. Petrella, S., A. Aubry, G. Janvier, E.P. Coutant, A. Cartier, T.H Dao, F.J. Bonhomme, L. Motreff, C. Pissis, C. Bizet, D. Clermont, E. Begaud, P. Retailleau, H. Munier-Lehmann, E. Capton, C. Mayer, Y.L. Janin. 2016. Synthesis and evaluation of original bioisosteres of bacterial type IIA topoisomerases inhibitors. *Can J Chem* 94(3): 240-250
22. Mougari F, Bouziane F, Crockett F, Nessar R, Chau F, Veziris N, Sapriel G, Raskine L, Cambau E. Selection of Resistance to Clarithromycin in Mycobacterium abscessus Subspecies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Dec 27;61(1).
23. Raharolahy O, Ramarozatovo LS, Ranaivo IM, Sendrasoa FA, Andrianarison M, Andrianarivelo MR, Cambau E, Rabenja FR. A Case of Fluoroquinolone-Resistant Leprosy Discovered after 9 Years of Misdiagnosis. *Case Rep Infect Dis*. 2016;
24. Mieras L, Anthony R, van Brakel W, Bratschi MW, van den Broek J, Cambau E, Cavaliero A, Kasang C, Perera G, Reichman L, Richardus JH, Saunderson P, Steinmann P, Yew WW. Negligible risk of inducing resistance in Mycobacterium tuberculosis with single-dose rifampicin as post-exposure prophylaxis for leprosy. *Infect Dis Poverty*. 2016 Jun 8;5(1):46

Publications nationales

1. Guglielmetti L., Robert J. 2015. Bédaquiline : de l'in vitro aux essais cliniques d'un nouvel antituberculeux. *J Anti-infectieux* 17.
2. Hervé C, Bergot E, Veziris N, Blanc F-X. 2015. [Tuberculosis in 2015: From diagnosis to the detection of multiresistant cases]. *Rev Mal Respir* 32:784–790.
3. Reibel F, Cambau E, Aubry A. 2015. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect* 45:383–393.
4. Reibel F, Cambau E, Aubry A. 2015. Les anti-lépreux. *Journal des anti-infectieux*.
5. Robert J. 2015. Focus. Résistance aux antituberculeux en France en 2013.
6. Brossier F, Aubry A. 2016. Résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux. *Feuillets de biologie* 328:17–25.
7. Lafeuille E, Veziris N, Sougakoff W, Roure F, Le Dû D, Dournon N, Caumes E, Jarlier V, Aubry A, Robert J, Bernard C. 2016. XDR-tuberculosis in France: Community transmission due to non-compliance with isolation precautions. *Med Mal Infect* 46:52–55.
8. Maitre T, Aubry A, Jarlier V, Robert J, Veziris N, CNR-MyRMA. 2016. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis. *Med Mal Infect* Sep 13;pii: S0399-077X(16)30143-3.

Chapitres d'ouvrage

1. Biosafety in the laboratory diagnosis of tuberculosis, Maryse Fauville-Dufaux, Vincent Jarlier, Dick van Soolingen, Sven Hoffner in « Tuberculosis handbook » (ECDC, 1st édition 2011; 2nd édition 2016).
2. First- and second-line drug susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis complex Emmanuelle Cambau, Sabine Rüsck-Gerdes in « Tuberculosis handbook » (ECDC, 1st édition 2011; 2nd édition 2016).

Communications internationales (sans invitation)

1. Brossier F., Guindo D., Pham A., Reibel F., Sougakoff W., Veziris N., Aubry A. Performance of the new V2.0 of the GenoType MTBDRsl test. 47th Union World Conference on Lung Health, Royaume-Uni, 2016
2. Brossier F., Pham A., Bernard C., Jarlier V., Aubry A., Veziris N., Sougakoff W. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of resistance to second line injectable drugs in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in France. European Molecular Biology Organization Conference Tuberculosis, Paris, 2016



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

3. Brossier F., Sougakoff W., Bernard C., Veziris N., Aubry A., on behalf of the CNR-MyRMA Molecular and phenotypic diagnosis of ethionamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a seven-year experience in France. 47th Union World Conference on Lung Health, Royaume-Uni, 2016
4. Guglielmetti L., Jaspard M., Le Dû D., Lachâtre M., Lemaire B., Marigot-Outtandy D., Rioux C., Veziris N., Bernard C., Robert J., Yazdanpanah Y., Caumes E., Jachym M. Prolonged bedaquiline treatment for multidrug-resistant tuberculosis: first report of safety and long-term outcome. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Pays-Bas, 2016

Communications nationales (sans invitation)

1. Andrejak C., Peuchant O., Segonds C., Terru D., Schramm F., Veziris N., Le Palud P., Duez J., Hamdad F., Bemer P., Réseau Mycomed Infections pulmonaires à mycobactéries non tuberculeuses en France : étude de cohorte de 499 cas entre 2009 et 2012. 20ème Congrès de Pneumologie de Langue Française, Lille, 2016
2. Aubry A., Sougakoff W., Lemaitre N., Raskine L., Jarlier V., Veziris N. Performance du test phénotypique de sensibilité à l'éthambutol avec le coffret « *M. tuberculosis* Susceptibility Test Kit ». 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris, 2016
3. Brossier F., Pham A., Bernard C., Jarlier V., Aubry A., Veziris N., Sougakoff W. Analyse des discordances entre les résultats des méthodes phénotypique et génotypique de détection de la résistance aux antibiotiques injectables de seconde ligne dans les souches cliniques multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis*. 14èmes Journées de Mycobactériologie de Langue Française, Tours, 2016
4. Jaspard M., Guglielmetti L., Le Du D., Lachâtre M., Lemaire B., Marigot-Outtandy D., Rioux C., Veziris N., Bernard C., Robert J., Yazdanpanah Y., Caumes E., Fréchet-Jachym M. Tolérance et efficacité d'un traitement prolongé avec bedaquiline dans la tuberculose multi résistante. 17ème Journées Nationales d'Infectiologie, Lille, 2016
5. Le Du D., Marigot-Outtandy D., Jaspard M. J., Lachatre M., Rioux C., Szmigiel D., Lemaire B., Aubry A., Bernard C., Barnier A., Blanc F-X., Yazdanpanah Y., Caumes E., Veziris N., Fréchet-Jachym M. Délamanide et tuberculose MDR : premier retour d'expérience en France. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris, 2016
6. Sougakoff W., Pang S., Refregier G., Capton E., Brossier F., Aubry A., Veziris N., Robert J., Jarlier V. Apports et limites du séquençage des génomes de *Mycobacterium tuberculosis*. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris, 2016
7. Veziris N., Bernard C., Maitre T., Robert J., Aubry A. Comparaison des milieux MH et 7H9 pour l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques de *M. avium* complex. 14èmes Journées de Mycobactériologie de Langue Française, Tours, 2016.
8. A. Aubry*, W. Sougakoff, N. Lemaitre, R. Raskine, V. Jarlier, N. Veziris (pour le CNR-MyRMA). Performance du test phénotypique de sensibilité à l'éthambutol avec le coffret « *M. tuberculosis* Susceptibility Test Kit ». Journées de Mycobactériologie de Langue Française. Tours. 2016.
9. Veziris N., Bernard C., Guglielmetti L., Le Du D., Marigot-Outtandy D., Jaspard M., Caumes E., Lerat I., Yazdanpanah Y., Tiotiu A., Lemaitre N., Brossier F., Jarlier V., Robert J., Sougakoff W., Aubry A. pour le CNR-MyRMA La résistance à la bédaquiline en France existe-t-elle déjà ? 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris, 2016.
10. Sougakoff W. Action coordonnée tuberculose (Inserm-IMMI). "Retour d'expérience sur le NGS appliqué aux souches MDR" INSERM, Paris, 2016

Communications internationales sur invitation

1. Aubry. A. Fluoroquinolone low-level resistance: an opportunity for improving XDR-TB treatment, 47th Union World Conference on Lung Health, Liverpool, UK. 2016
2. Aubry. A. Diagnostic performances of existing molecular and phenotypic assays for the diagnosis of fluoroquinolone resistance, 47th Union World Conference on Lung Health, Liverpool, UK. 2016
3. Veziris N. Can fluoroquinolones be used for the treatment of XDR-TB? Lessons from animal studies. 47th Union World Conference on Lung Health, Royaume-Uni, 2016



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

4. Veziris N. Redefining breakpoints for M. tuberculosis drug resistance. 47th Union World Conference on Lung Health, Royaume-Uni, 2016
5. Jarlier V. Algorithm for TB diagnosis in micro-la ; International workshop on the impact of in vitro diagnosis on the clinical management of drug resistant tuberculosis; Chinese Academy of medical sciences Chine, 2016
6. Jarlier V. Surveillance of MDR-TB: from region to Europe; ESCMID postgraduate education course "Difficult to treat mycobacterial infections Croatie, 2016
7. Jarlier V. Update of the Care project; Strategy committee annual meeting of the China anti-drug resistance project; China Medical association & Fondation Mérieux, Hangzhou, Chine Chine, 2016
8. Sougakoff W. ESCMID Post Graduate Education Course on mycobacterial infections (ESGMYC group) : "Difficult to treat mycobacterial infections" ESCMID, Croatie, 2016

Émissions radio, TV

1. Jarlier V. Emission « Tuberculose », Radio France Internationale, novembre 2014
2. Jarlier V. Emission « Plans de sauvegarde des antibiotiques » TV-RMC, JJ Bourdin, septembre 2016
3. Jarlier V. Emission « Abus d'antibiotiques : une catastrophe annoncée » France 5, octobre 2016

Organisation de colloques / congrès

1. Aubry A. Organisation of a symposium "M.tuberculosis low-level resistance : a challenge for the laboratory, an opportunity for MDR and XDR treatment", 47th Union World conference on Lung Health, Liverpool, 2016
2. Aubry A. member of the organizing comitee of the "Topo-Club: journée de rencontre autour de la topologie de l'ADN », Institut Jacques Monod, Paris, 2016
3. Jarlier V. Coordination of the ESCMID postgraduate education course "Difficult to treat mycobacterial infections Croatie, 2016
4. Veziris N. Member of the ACAI organizing comitee of the RICAI congress (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris), 2015-2016
5. Veziris N. Organisation of a symposium " Quinolones: from bench to bedside", 47th Union World conference on Lung Health, Liverpool, 2016
6. Veziris N. Member of the scientific comitee of the SFM (Société Française de Microbiologie) congress, 2016



7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiènes alimentaires et environnementales

7.1. Santé animale

Nous poursuivons notre collaboration avec nos collègues des laboratoires en santé animale de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, du Muséum Nationale d'Histoire Naturelle – Ménagerie du Jardin des Plantes, du Service Vétérinaire du Zoo du Bois de Vincennes et du Laboratoire de mycobactériologie animale de l'AFFSA (Maisons-Alfort) en particulier les Dr Alexis LECU et Maria-Laura BOSCHIROLI.

Nous participons régulièrement aux réunions communes avec les vétérinaires et les responsables de l'assurance médicale des éleveurs (MSA, Dr G Deffontaines) pour les conseils et les investigations à mener (i) d'une part pour la prévention des cas de tuberculose à *M. bovis* pouvant survenir chez les éleveurs, (ii) d'autre part sur les épidémies de tuberculose bovine détectées dans les élevages et chez les animaux sauvages.

En 2016, nous avons reçu 2 biopsies cutanées (lésions de la face dorsale et du pédoncule de la nageoire caudale côté droit) prélevées chez un grand dauphin mâle vivant en captivité au parc marin Marineland d'Antibes. Ces 2 biopsies sont revenues négatives à la culture bien que l'une d'entre elle était très faiblement positive à l'examen direct (tests de biologie moléculaire également négatifs).

7.2. Environnement

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

7.2.1. Développements techniques

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

Développements en 2016 :

- Etude **du lien entre les mycobactéries de l'eau et les amibes**, dans le cadre du travail de Thèse de sciences de Vincent Delafont (Thèse soutenue en octobre 2015 dont E. Cambau était présidente du Jury, Université de Poitiers) en se focalisant sur les conditions de vie des mycobactéries dans les amibes.

- Nous avons testé **en 2016 la mise en œuvre d'un protocole de recherche de mycobactéries que nous avons mis au point spécifiquement pour les eaux des Heater-cooler**. Globalement, plus de 50% des GT étudiées étaient positifs avec des micro-organismes vivant usuellement dans l'eau tels que *Pseudomonas aeruginosa*, levures, champignons filamenteux. Après décontamination (cétylpyridinium) du prélèvement pour éliminer *P.aeruginosa* et autres microorganismes qui envahissent les cultures, nous avons pu cultiver des mycobactéries des espèces *M. chelonae*, *M. chimaera* ou *M. mucogenicum*.

- Un **protocole de recherche des mycobactéries applicable plus largement aux eaux** (eaux de



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

ruissellement, réseaux d'eau potable...) a été mis au point en collaboration avec Eau de Paris afin de standardiser cette recherche. Ce protocole a été testé avec des échantillons artificiels d'eauensemencé avec des quantités croissantes de *M. chimaera* et autres mycobactéries. Les résultats seront disponibles en 2017. Dès validation, ce protocole sera mis à la disposition des laboratoires sur le site du CNR.

7.2.2. Expertise lors d'évènements

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

En 2016 (cf section 4 « Alertes » pour les détails) nous avons participé aux enquêtes concernant des cas groupés de tuberculose ou d'infections à mycobactéries non tuberculeuses.

7.3. Alimentation

L'alimentation n'a pas été jusqu'à présent impliquée dans la survenue d'infections à mycobactéries, ni dans les chaînes de transmission, sauf bien entendu dans la tuberculose à *M.bovis* (consommation de lait contaminé cru). Nous n'avons pas été jusqu'à ce jour impliqué dans la recherche de *M.bovis* dans la chaîne alimentaire.



Annexe 1 : Missions, équipes, locaux, équipements, démarche qualité

1. Missions : cahier des charges de l'appel d'offre pour la période 2012 – 2016

Le Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux et ses éventuels laboratoires associés s'engagent à assurer les missions définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 fixant les modalités de désignation et les missions des CNR.

Il sera particulièrement demandé au Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux de :

1. Apporter son expertise microbiologique :

- développer et évaluer les nouvelles techniques de diagnostic de la maladie et de l'infection tuberculeuse ainsi que le diagnostic des infections à mycobactéries non tuberculeuses et à mycobactéries dites rares,
- identifier les souches de mycobactéries du complexe tuberculosis et les autres espèces de mycobactéries adressées par les laboratoires,
- étudier la sensibilité des souches mono, multi et ultra résistantes, y compris vis-à-vis des anti-infectieux non utilisés usuellement, en développant les techniques adaptées, notamment les méthodes moléculaires de diagnostic rapide,
- contribuer à l'étude des mécanismes de résistance aux antituberculeux en collaboration avec le Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques,
- participer au contrôle de qualité des tests de sensibilité aux antituberculeux pratiqués par les laboratoires de biologie médicale,
- assurer un appui au diagnostic aux biologistes confrontés à des souches résistantes et un appui thérapeutique aux cliniciens et aux centres de lutte antituberculeuse pour l'établissement de protocoles de traitement/prophylaxie adaptés aux souches en cause.

2. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'institut de veille sanitaire :

- contribuer à la surveillance de la méningite tuberculeuse, des mycobactérioses et de la lèpre,
- contribuer à l'investigation des cas groupés ou d'épidémies en réalisant l'identification, le typage moléculaire et l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de mycobactéries,
- contribuer à la surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antituberculeux et de la résistance multiple de *M. tuberculosis*, en s'appuyant sur les réseaux existants et en veillant à leur représentativité,
- participer aux systèmes de surveillance européens et internationaux.

3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : augmentation inhabituelle de cas ou modification de leurs caractéristiques ; apparition de cas groupés ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), modification des profils de résistance ; apparition de souches inhabituelles ; etc.



2. Equipes

Laboratoire coordonnateur (Site hospitalier Pitié-Salpêtrière) (Tableau 33)

- 1 PU-PH chef de service, 1 PU-PH adjoint, 3 MCU-PH, et 1 PH du service de Bactériologie-Hygiène du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix et Université Paris 6 (AP-HP (1,45 ETP, financement APHP)
- **1 médecin contractuel (PHC, 1ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **2 Techniciens financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (2 ETP)**
- 2 Techniciens (1 ETP, financement AP-HP)
- 1 Secrétaire (0,25 ETP, financement AP-HP)
- 1 cadre (0,1 ETP, financement AP-HP)
- 1 Technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 Technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 Animalier (financement fonds associatifs)

Des étudiants en Master 2 et en Thèse encadrés par l'équipe INSERM à laquelle est adossée le service (équipe N°13 « Mécanismes d'émergence et de diffusion de la multirésistance chez les Mycobactéries et les entérobactéries » intégrée à UMRS CR7-INSERM 1135 « Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI) », Paris 6, site Pitié-Salpêtrière) participent aux travaux de recherche menés en collaboration avec le CNR (4 à 6 étudiants présents simultanément).

Laboratoire associé (Site hospitalier Lariboisière) (Tableau 34)

- 1 PU-PH chef de service et 1 PH, du service de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière et Université Paris 7 (0,35 ETP, financement AP-HP)
- **1 praticien attaché (0,1 ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **1 Technicien financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (1 ETP)**
- 2 Techniciens (0,5 ETP, financement AP-HP)

Des étudiants en Master 2 et en Thèse encadrés par l'équipes INSERM à laquelle est adossée le service (UMR1137 IAME, Paris 7) participent aux travaux de recherche menés en collaboration avec le CNR (1 à 2 étudiants présents simultanément).

Tableau 35 : Liste nominative des personnels participants aux activités du laboratoire coordonnateur (site Pitié) et du laboratoire associés (site Lariboisière) : fonction, temps dédié au CNR-MyRMA en 2013 (en ETP), qualification, statut, site et organisme payeur

Nom	Prénom	Fonction	ETP	Qualification	Statut	Site	Organisme payeur
Jarlier	Vincent	Directeur	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Cambau	Emmanuelle	Respons. labo. associé	0,15	Médecin biol.	PU-PH	Lariboisière	AP-HP
Veziris	Nicolas	Microbio/pneumologue	0,5	Médecin	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Bernard	Christine	Microbiologiste	1	Pharm. biol.	PH contr.	Pitié	INVS
Raskine	Laurent	Microbiologiste	0,2	Médecin biol.	PH	Lariboisière	AP-HP
Aubry	Alexandra	Microbiologiste	0,1	Médecin biol.	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Brossier	Florence	Microbiologiste	0,1	Pharm. biol.	PH	Pitié	AP-HP
Sougakoff	Wladimir	Microbiologiste	0,25	Scientifique	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Robert	Jérôme	Epidémiologiste	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Benmansour	Hana	Microbiologiste	0,1	Pharm. biol	P Att	Lariboisière	<u>INVS</u>
Golamhosem	Shenaz	Technicienne	0,5	Technicienne	Tech	Pitié	AP-HP
Millot	Gérald	Technicien	0,5	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
Bekhti	Meriem	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	<u>INVS</u>
Gandy	Lucas	Technicien	1	Technicienne	Tech	Pitié	<u>INVS</u>
Charlier	Véronique	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Brisilliat	Christine	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Kumanski	Sylvain	Technicien	1	Technicien	Tech	Lariboisière	<u>INVS</u>
Catalano	Francesca	Secrétaire	0,25	Secrétaire		Pitié	AP-HP
Venet	Lydia	Cadre	0,1	Cadre		Pitié	AP-HP

3. Locaux

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, 2^e étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, site Pitié-Salpêtrière, superficie totale du laboratoire 1000 m².

Les activités se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité L3 (150 m²) consacré à la mycobactériologie, à la manipulation des bactéries de classe 3 (salmonelles, brucelles...) et aux alertes Biotox.
- dans les pièces adjacentes (100 m²) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage...).

La gestion informatique des réseaux partenaires, ainsi que l'animalerie de chimiothérapie expérimentale, sont localisées dans la partie universitaire du laboratoire, au 5^e étage de la Faculté de Médecine PM Curie, site Pitié-Salpêtrière, située sur le même campus.

Laboratoire associé (Groupe hospitalier St Louis-Lariboisière)

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

Les activités du CNR se déroulent :

- dans laboratoire de sécurité L3 (construction modulaire de 50 m² à l'extérieur du bâtiment Civiale).
- dans des pièces (39 m²) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage...).

4. Principaux équipements

Laboratoire coordonnateur (Site hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de sécurité L3 et ses annexes

- 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,
- autoclave double entrées



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

- caméra de lecture de plaque sensitive et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®,
- microscopes à fluorescence lampe vapeur de mercure et lampe LED, microscopes classiques,
- spectrophotomètre portatif (Ultrospec10 de chez Dutscher),
- sorbonne pour la coloration de Ziehl-Neelsen,
- colorateur de lames,
- 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 (QIAGEN),
- 2 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine),
- 2 amplificateurs automatisés pour PCR « en temps réel » (MJResearch PTC-200, ABI7000),
- 1 amplificateur FluoroCycler 12 (Hain Lifescience) spécialement conçu pour les tests FluotoType MTB pour le diagnostic de tuberculose dans les prélèvements (implanté en 2016)
- Un extracteur d'ADN GenoXtract12 (Hain Lifescience) automatisé pour l'extraction de l'ADN de M.tuberculosis à partir de prélèvements (implanté en 2016)
- matériel d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
- automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,
- séquenceurs ADN : les séquences d'ADN sont déterminées par un prestataire externe (GATC) à partir de produits PCR
- 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 chimioluminescence,
- 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).

Autres équipements

- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker),

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 (Site hospitalier Lariboisière)



Laboratoire de sécurité L3

- Equipement pour le traitement des échantillons médicaux,
- 3 postes de sécurité microbiologique,
- 3 incubateurs (30 et 37°C) pour milieux solides et liquides,
- 3 automates de culture en milieu liquide (MGIT960TB®, Becton-Dickinson) 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 1^{ere} 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 (Heliosy Thermos),
- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000,
- 5 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR,
- 1 amplificateur automatisé pour PCR « en temps réel » (Cepheid 4 modules),
- 2 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (Rotor Gene et Smart Cycler),
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20 pour les bandelettes Hain Biocentric,
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator,
- 2 séquenceurs 16 capillaires Applied Biosystem d'accès facile (commun à plusieurs laboratoires),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- 1 équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé (Pharmacia LKB Gene Navigator),
- 1 imageur (GelDoc XR Biorad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV,
- 1 automate pour électrophorèse capillaire d'ADN (Agilent) commun à plusieurs laboratoires pour test de génotypage Diversilab®,
- 1 séquenceur GS Junior 454 (Roche)

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.

5. 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, Elimination des déchets, Biologie moléculaire, Souchothèque.

Procédure annexe : Prélèvements.

Ce groupe s'est aussi engagé dans la rédaction de **recommandations de Juste Prescription Biologique** des



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 coordonnateur et le laboratoire associé appartiennent, respectivement le Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix (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 des non-conformités, (2) contractualisation prescripteurs/ laboratoires (3) infrastructures et locaux. Ces groupes de travail incluent des membres du CNR-MyRMA et, plus largement, les personnels des laboratoires hébergeant le CNR.

Chacun des deux laboratoires (coordonnateur et associé) du CNR-MyRMA est, tout au long du processus qui s'étalera sur 6 ans, accrédité à travers l'ensemble des laboratoires du groupe hospitalier auquel il appartient (« pôle biologie médicale »), ensemble considéré par le COFRAC comme un laboratoire unique (cf pièces jointes dossier candidature 2017-21).

Participation à des contrôles de qualité externe

Chacun des 2 laboratoires du CNR-MyRMA (coordonnateur et associé) a participé en 2015 au contrôle de qualité externe (CQE) des différentes étapes du diagnostic de la tuberculose organisés dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB par la société Instand (Dusseldorf, Allemagne). Ce CQE comportait :

- 5 échantillons pour l'examen microscopique
- 5 échantillons pour la culture
- 5 échantillons pour le diagnostic génotypique de tuberculose (PCR)
- 5 souches de mycobactéries non tuberculeuses pour identification
- 5 souches pour les tests de sensibilité génotypiques à 7 antituberculeux, soit 35 tests
- 5 souches pour les tests de sensibilité phénotypiques à 11 antituberculeux soit 55 tests

Au total, ce CQE représentait 110 tests à effectuer dans chacun des 2 laboratoires.

Les résultats obtenus étaient conformes dans chacun des 2 laboratoires qui ont donc reçu un **certificat de qualité**.

Le CNR-MyRMA participe aux contrôles de qualité européens de génotypage MIRU-VNTR en tant que membre du Global Network for the Molecular Surveillance of Multidrug Resistant Tuberculosis organisé par D. van Soolingen (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas). Lors de chaque contrôle, une trentaine d'extraits d'ADN de *M.tuberculosis* sont analysés par la méthode MIRU-VNTR 24.

- Les résultats du 1er CQE réalisé en **2010** ont été publiés en 2012 (*de Beer JL et al. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):662-669*).
- Les résultats du 2ème CQE réalisé en **2011** ont été publiés en 2014 (*de Beer JL et al. Int J Tuberc Lung Dis. 2014 May;18(5):594-600*).
- 3ème CQE en **2013**
- 4ème CQE en **2014**

Les résultats obtenus par le CNR-MyRMA lors des 4 premiers CQE **étaient très bons**.

- En raison d'une erreur d'adressage, nous n'avons pas reçu les échantillons du 5^{ème} CQE organisé en 2015.
- 6^{ème} CQE en 2016 : les résultats du 6^{ème} CQE réalisé en 2016 **étaient excellents** (score de 100%)

En 2016, le CNR-MyRMA a participé pour la première fois à un contrôle de qualité européen (**WGS pilot EQA**) de **génotypage WGS** organisé par R. Anthony (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas). Dans ce contrôle qualité, 5 extraits d'ADN de *M.tuberculosis* ont été analysés par séquençage complet des génomes (technique Illumina). **Les résultats obtenus étaient excellents**, l'accord entre les résultats génomiques et les phénotypes de résistance étant de 100%. Le génotypage par analyse du locus « DR » à partir des résultats génomiques a permis de déterminer sans ambiguïté les lignées auxquelles se rattachent les 5 souches. La comparaison phylogénétique réalisée à partir des SNP identifiés entre les 5 souches a montré que 2 des 5 souches analysées étaient identiques (3 SNP différents détectés sur ~ 4 10⁶ bases analysées).



Contrôles de qualité externe organisés par le CNR-MyRMA pour les laboratoires du réseau « AZAY-mycobactéries »

Nous organisons depuis 2003, tous les 2 à 3 ans, 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 universitaires du réseau Azay-mycobactéries (cf « Surveillance de la résistance primaire et secondaire »).

Un CQE a été organisé en 2015 : 3 souches de *M. tuberculosis* complex ont été **envoyées à 37 laboratoires** pour **mesure de la sensibilité** aux 4 antibiotiques de 1^{ère} ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine). Globalement, **99% des résultats étaient conformes**. Les résultats étaient tous conformes pour 34/37 laboratoires, 2 laboratoires ayant fourni 91% et 73% de résultats conformes, respectivement.

Un prochain contrôle sera organisé en 2017 ou 2018 si les crédits alloués le permettent.

Contrôles de qualité externe nationaux

Le CNR-MyRMA a conçu et commencé à planifier, à la demande de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), un contrôle de qualité portant sur l'identification des mycobactéries et les tests de sensibilité de *M. tuberculosis* complex **destiné à l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie en France**. Les modalités de financement ont été étudiées en 2016 par la direction des finances du GH Pitié-Salpêtrière, le CNR-MyRMA et l'ANSM.

Traçabilité

La traçabilité concerne principalement les échanges entre les laboratoires demandeurs et les 2 laboratoires du CNR-MyRMA et les échanges entre le laboratoire coordonnateur et le laboratoire associé.

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) étaient archivées telles quelles jusqu'en novembre 2012, date à laquelle le nouveau système de gestion de laboratoire (GLIMS, Société MIPS) a été mis en place. Depuis, les demandes et pièces jointes sont saisies et archivées via un scanner spécifique (ScanBac® Ordo) dans le SGL du laboratoire coordonnateur. Une copie des demandes transmises au laboratoire associé est conservée par le laboratoire coordonnateur. Les feuilles de demande sont horodatées pour tracer (1) le jour et heure d'arrivée du prélèvement / souche dans le L3 et (2) le jour et heure de décision des analyses à réaliser sur ce prélèvement / souche par le biologiste.

La traçabilité des rendus de résultats est assurée pour les paramètres suivants : identité des correspondants (biologiste, clinicien, autorité sanitaire), mode de rendu (fax, 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 paillassé) 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.

Traçabilité des matériels reçus et conservés

Les tubes de conservation des souches, prélèvements ou autres (extrait ADN par exemple) sont numérotés et classés.

Traçabilité des réunions de travail

Chaque RCP du « Groupe thérapeutique » et chaque réunion des membres du CNR-MyRMA sont tracées par une feuille de présence et un compte rendu écrit.



Annexe 2 : Capacités techniques du CNR-MyRMA

1. Techniques de référence disponibles au CNR-MyRMA

1.1. Techniques phénotypiques

Techniques de diagnostic

- Microscopie,
- Cultures en milieux solides et liquides.

Techniques d'identification

- Techniques phénotypiques classiques (caractères cultureux, morphologiques et biochimiques),
- Immunochromatographie (AgMPT64®, Eurobio...),
- Spectrométrie de masse en MALDI-TOF

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

Techniques de routine

- 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, bédaquiline) n'étant pas 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 MGIT avec utilisation du logiciel TBEXiST appliqué à une détermination semi-quantitative de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux
- Détermination des CMI en milieu liquide sur microplaque (Trek®) pour les mycobactéries à croissance lente et rapide (imipénème, cefoxitine, amikacine, streptomycine, tobramycine, clarithromycine, ciprofloxacine, moxifloxacine, linézolide, minocycline, docycycline, tigecycline, triméthoprime-sulfaméthoxazole, rifampicine, rifabutine, isoniazide, éthionamide, éthambutol),
- 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 (IC₅₀) pour les fluoroquinolones,
- Méthodes in vivo : modèles de chimiothérapie expérimentale chez la souris pour *M.tuberculosis*, *M.leprae*, *M.ulcerans*, *M.avium*, *M.abscessus*.

1.2. Techniques génotypiques

Les techniques génotypiques utilisées sont listées dans le **Tableau 36**, séparément pour l'identification, les tests de



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

sensibilité aux antimycobactériens (mutations impliquées dans la résistance acquise) et le géoypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques).

Tableau 36 : Techniques génotypiques disponibles au CNR-MyRMA

a. Identification des espèces

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

* Gamme Genotype, Hain Lifescience

b. Détection de mutations déterminant la résistance acquise aux antimycobactériens

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



c. Génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques)

Mycobactéries	Techniques commercialisées	Autres techniques
<i>M. tuberculosis</i> complex	MIRU-VNTR 24 loci MIRU 4 loci hypervariables si souche Beijing	
Mycobactéries non tuberculeuses	Diversilab	Electrophorèse en champ pulsé

d. Séquençage génome entier (« haut débit »)

Mycobactéries	Techniques
Toutes	ILLUMINA MiSeq Roche GS Junior

2. Marqueurs épidémiologiques disponibles

- **Marqueurs de résistance** (mutations chromosomiques) pour *M.tuberculosis*
- **Marqueurs utilisés pour le typage** (phylogénie et empreintes digitales) :
 - o MIRU-VNTR 24 loci (+les 4 loci supplémentaires hypervariables spécifiques pour les souches Beijing) pour *M.tuberculosis*
 - o REP-PCR pour les mycobactéries non tuberculeuses
 - o Spectrométrie de masse MALDI-TOF pour les mycobactéries non tuberculeuses
 - o Electrophorèse en champ pulsé pour les mycobactéries non tuberculeuses
 - o SNP 14676, 1642875, 2935685 pour *M.leprae*
- **Séquençage génome** entier pour toutes les mycobactéries

3. 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. Pour répondre aux besoins dans ce domaine et dans l'objectif d'aider à rationaliser les tests de sensibilité aux antituberculeux, mais aussi avec le souci d'éviter les échanges de souches multirésistantes qui sont hautement dangereuses, nous avons préparé des souches monorésistantes (à l'isoniazide, haut et bas niveau de résistance, à la rifampicine, à la streptomycine et à l'éthambutol). Pour cela, des mutants résistants ont été sélectionnés in vitro lorsque des souches d'origine clinique n'étaient pas disponibles (**Tableau 37**).

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

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



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

Condition de stockage

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

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

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

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

Conditions de mise à disposition des collections

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

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

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

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

- Microscopie à fluorescence avec lampe LED ou optique après coloration de Ziehl-Neelsen,
- Cultures en milieu solides et liquides,
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* par amplification génique (ex. hybridation sur bandelettes genre Genotype ®...) directement à partir des prélèvements de tout nouveau patient pour lequel l'examen microscopique est positif (recommandations du HCSP, 2014),
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* dans les cultures par hybridation directe avec sonde Accuprobe® ou amplification-hybridation sur bandelettes (ex. Genotype ®...) ou techniques immunochromatographiques (ex. kit SD BioLINE TB Ag MPT64, Eurobio...) pour tout nouveau cas (recommandations du HCSP, 2014),
- Identification des mycobactéries non tuberculeuses courantes (*M.gordoniae*, *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 la détection précoce de la multi-résistance par PCR avec sondes intégrées ou pCR puis hybridation inverse sur bandelettes ou séquençage, pour tout nouveau patient pour lequel les prélèvements ont un résultat d'examen microscopique positif (M+), ou pour lequel l'examen microscopique est négatif mais la culture positive (M-C+). Cette recherche peut être utilement couplée à la recherche de mutations conférant la résistance à l'isoniazide. Le résultat de ces tests doit pouvoir être disponible dans un délai maximal de 72 heures (recommandations du HCSP, 2014).

Sur la base de l'arrêté du 16 juillet 2007 et des recommandations européennes sur le confinement dans les laboratoires de biologie, la manipulation des échantillons destinés à la recherche de mycobactérie requière les conditions suivantes :



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

- examen microscopique et mise en culture : confinement L2,
- identification rapide d'une culture positive sans subculture (immunochromatographie, hybridation sur sonde sans amplification, amplification-hybridation sur bandelette, amplification avec sonde intégrée) : confinement L2,
- subcultures de mycobactéries non tuberculeuses (ex. antibiogramme) : confinement L2,
- subcultures de *M.tuberculosis* complexe (ex. antibiogramme) : confinement L3.

Afin de pouvoir le plus rapidement possible fournir au personnel soignant et l'entourage familial des patients les éléments permettant de guider la prise en charge des patients et les mesures sanitaires (ex. isolement des patients et enquête dans l'entourage), l'identification des cultures positives doit être menée le plus rapidement possible (dans les 72h) avec des techniques applicables dans tous les laboratoires pratiquant les primocultures car ne nécessitant pas de subculture et donc pas de confinement L3 :

- immunochromatographie (très rapide, peu coûteux),
- amplification génique suivie d'une hybridation réverse sur bandelette,
- amplification génique en temps réel avec hybridation sur sondes intégrées.



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

**Cas de tuberculose
multirésistante (MDR) et ultrarésistante (XDR)
(souches reçues au CNR-MyRMA)**

Rapport trimestriel destiné aux autorités sanitaires

Alexandra Aubry
Christine Bernard
Vincent Jarlier
Jérôme Robert
Nicolas Veziris

02/02/16



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Tableau 1 : Distribution par pays de naissance des cas de tuberculose MDR (souches CNR-MyRMA 2006- 15)

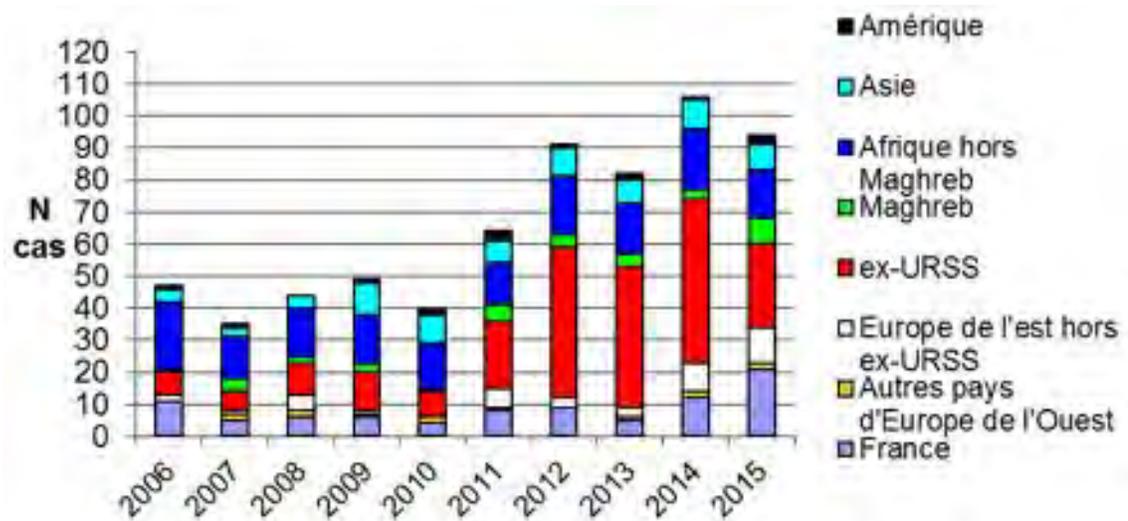
Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
France	11	5	6	6	4	8	9	5	12	21
Allemagne								1		1
Norvège				1						
Portugal		2	2		2	1			2	1
Total Europe Ouest	11	7	8	7	6	9	9	6	14	23
Albanie										1
Roumanie	2	1	5	1		6	3	3	9	6
Pologne										2
Bulgarie								1		2
Moldavie	1	1	1		1	1	1			
Russie hors Tchécémie	2		1	2	1	7	6	2	4	3
Russie - Tchécémie	1	1	5	3	4	4	8	3	1	6
Arménie	1	1	2	3		4	2	1	3	1
Azerbaïdjan					1					
Géorgie	2	1	1	4	1	5	26	32	40	14
Kosovo								1		
Lituanie								2		
Ukraine		2					4	2	4	2
Total Eur Est + ex. URSS	9	7	15	13	8	27	50	47	60	37
Algérie	1	3	2	1	1	3	1	2	1	1
Maroc		1		2		1	2	1	1	6
Tunisie						1	1	1		1
Total Maghreb	1	4	2	3	1	5	4	4	2	8
Angola	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Bénin							1	1		
Cameroun		2	2		2			2	1	
Cap-Vert					1					
Congo	3	1	4	4	1		3		3	2
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	2	1	1	2	3
Djibouti	1									
Egypte							1		1	
Erythrée								1		
Ethiopie	1			1						1
Ghana				1						
Guinée Conakry	3	1	2		2	1	1	2	1	1
Madagascar-Comores		1		1				1		
Mali				1					1	
Mauritanie				1		1				
Niger			1							
Nigeria										1
Rep. Centrafricaine	1	1				1	2	1	2	2
RD Congo	4	5	1		2	5	5	4	6	2
Rwanda						1				
Sénégal	1		2	1	1		3	1	2	2
Soudan				1			1			
Tchad					1	1	1			
Togo	1							1		
Total Afr. hors Maghreb	21	13	15	15	14	13	19	16	19	15
Bangladesh							1		1	
Cambodge			1							
Chine	1	1	1	2	1	1	3	1	1	5
Corée				2						
Inde	2			2		1	2			
Indonésie									1	



CNR-MyrMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Irak									1	
Mongolie					2	1	1			
Népal	1							1		
Pakistan			1	1	1	2	2	1		1
Sri Lanka		1							1	
Syrie				1						
Thaïlande							1		1	1
Tibet		1			3			1		1
Turquie								1		
Vietnam			1	2	2	1		2	3	
Total Asie	4	3	4	10	9	7	9	7	9	8
Chili				1						
Colombie										1
Bésil										1
Haïti					1	1	1			
Equateur								1	1	
Pérou	1	1			1			1		1
Total Amérique	1	1	0	1	2	3	1	2	1	3
Non précisé								1	4	4
TOTAL	48	35	44	49	40	64	92	83	111	98

Figure 1 : Répartition par groupe de pays de naissance des cas de tuberculose MDR (souches CNR-MyrMA 2006 – 2015)





CNR-MyrMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Tableau 2 : Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2015

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Amérique	Asie	Europe de l'Est et ex-URSS	Total
2004		1 (Algérie)					1
2005			1 (Mali)				1
2006	1 (France)					1 (Tchéchénie)	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 Tchéchénie, 1 Géorgie, 1 Azerbaïdjan)	6
2011	1 (Portugal)	2 (Algérie)	1 (Côte d'Ivoire)			2 (Russie)	6
2012						17 (15 Géorgie, 1 Arménie, 1 Ukraine)	17
2013	1 (France)					21 (19 Géorgie, 1 Ukraine, 1 Roumanie)	22
2014	2 (France, Portugal)		1 (RD Congo)			23 (20 Géorgie, 3 Russie)	26
2015				1 (Brésil)	1 (Chine)	12 (6 Géorgie, 1 Pologne, 1 Roumanie, 2 Tchéchénie, 1 Russie, 1 Arménie)	14

Tableau 3 : Répartition par trimestre de réception au CNR-MyrMA de l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR, 2011 - 2015

	Total MDR	dont Europe Est et ex-URSS	Dont ex-URSS	Dont Géorgie
1er trim 2011	23	10	5	0
2ème trim 2011	15	4	3	1
3ème trim 2011	16	6	5	2
4ème trim 2011	15	8	8	2
1er trim 2012	21	12	11	5
2ème trim 2012	24	10	9	6
3ème trim 2012	23	12	11	7
4ème trim 2012	24	16	16	8
1er trim 2013	26	17	16	11
2ème trim 2013	21	10	9	7
3ème trim 2013	15	9	6	5
4ème trim 2013	21	11	11	9
1er trim 2014	31	16	12	9
2ème trim 2014	25	15	14	9
3ème trim 2014	26	14	12	11
4ème trim 2014	30	15	13	11
1er trim 2015	23	11	7	5
2ème trim 2015	32	13	10	4
3ème trim 2015	23	8	6	4
4ème trim 2015	21	6	3	1



CNR-MyrMA rapport d'activité pour l'année 2015 (septembre 2016)

Figure 2 : Répartition par trimestre de réception au CNR-MyrMA de l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR de 2011 à 2015

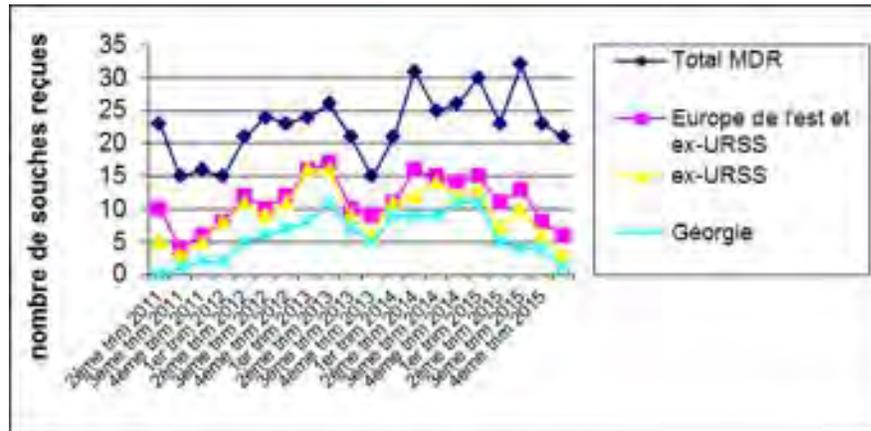


Tableau 4 : Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyrMA 2014 - 2015

Région	N souches reçues en	
	2014	2015
Alsace	5	2
Aquitaine	1	9
Auvergne		
Basse-Normandie	1	
Bourgogne		
Bretagne		2
Centre	2	1
Champagne-Ardenne		
Corse	1	1
Franche-Comté	2	
Guadeloupe		
Guyane		
Haute-Normandie	5	3
Île-de-France	58	48
La Réunion	2	
Languedoc-Roussillon	4	2
Limousin	1	1
Lorraine		1
Martinique		
Mayotte		
Midi-Pyrénées	3	3
Nord-Pas-de-Calais	7	6
Pays de la Loire		4
Picardie	1	
Poitou-Charentes		1
Provence-Alpes-Côte d'Azur	6	3
Rhône-Alpes	13	11
Total	112	98

Conclusions pour le dernier trimestre 2015

- Le nombre total de cas MDR reste au niveau haut des 4 dernières années.
- Le nombre de cas XDR est en diminution par rapport à l'année 2014 mais reste bien au-dessus du nombre de cas annuels observés avant l'augmentation de 2011.
- La diminution du nombre total de cas en provenance de Géorgie se confirme.
- L'augmentation du nombre de cas nés en France observée en 2014 se confirme en 2015.