



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



HÔPITAUX UNIVERSITAIRES
PITIÉ SALPÊTRIÈRE
CHARLES FOIX



ANALYSE GENOMIQUE DES SOUCHES DE *M. TUBERCULOSIS* MULTIRÉSISTANTES ISOLÉES EN FRANCE : EVOLUTION 2006-2018

W. Sougakoff, J. Jaffre, A. Aubry, N. Veziris, J. Robert, V. Jarlier

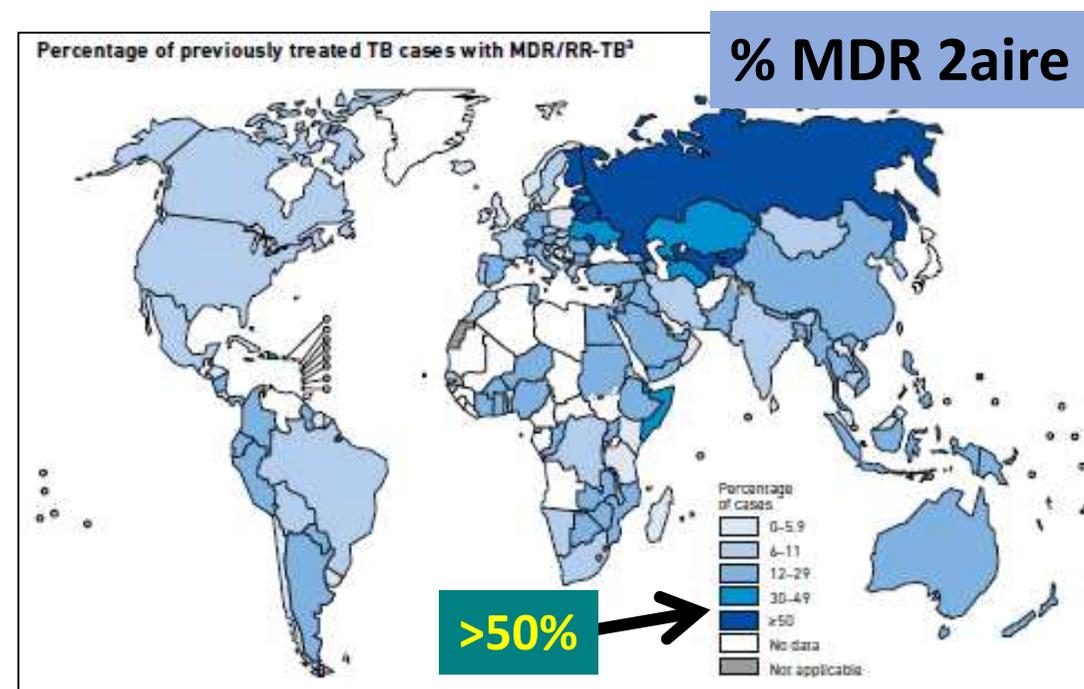
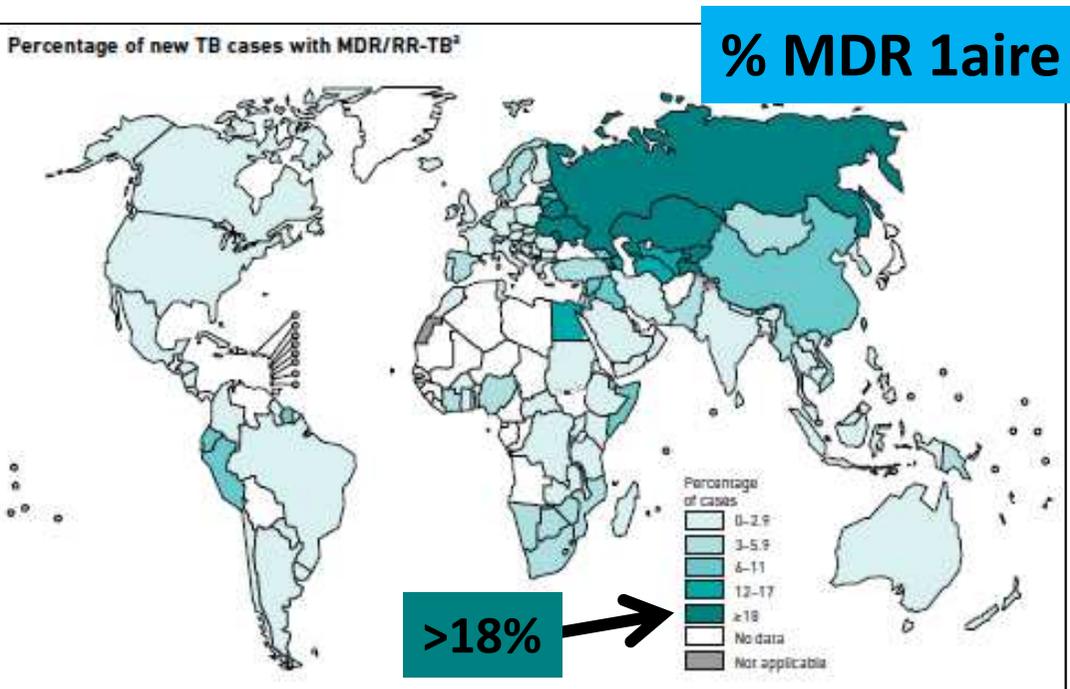
Centre National de référence des mycobactéries (CNR-MyRMA)

**Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
APHP.6**

Site Pitié-Salpêtrière

TB MDR dans le monde

	Incidence	N of deaths	% of death
All forms of TB	10^7	$1,3 \cdot 10^6$	13%
MDR-TB	550.000	230.000	42%



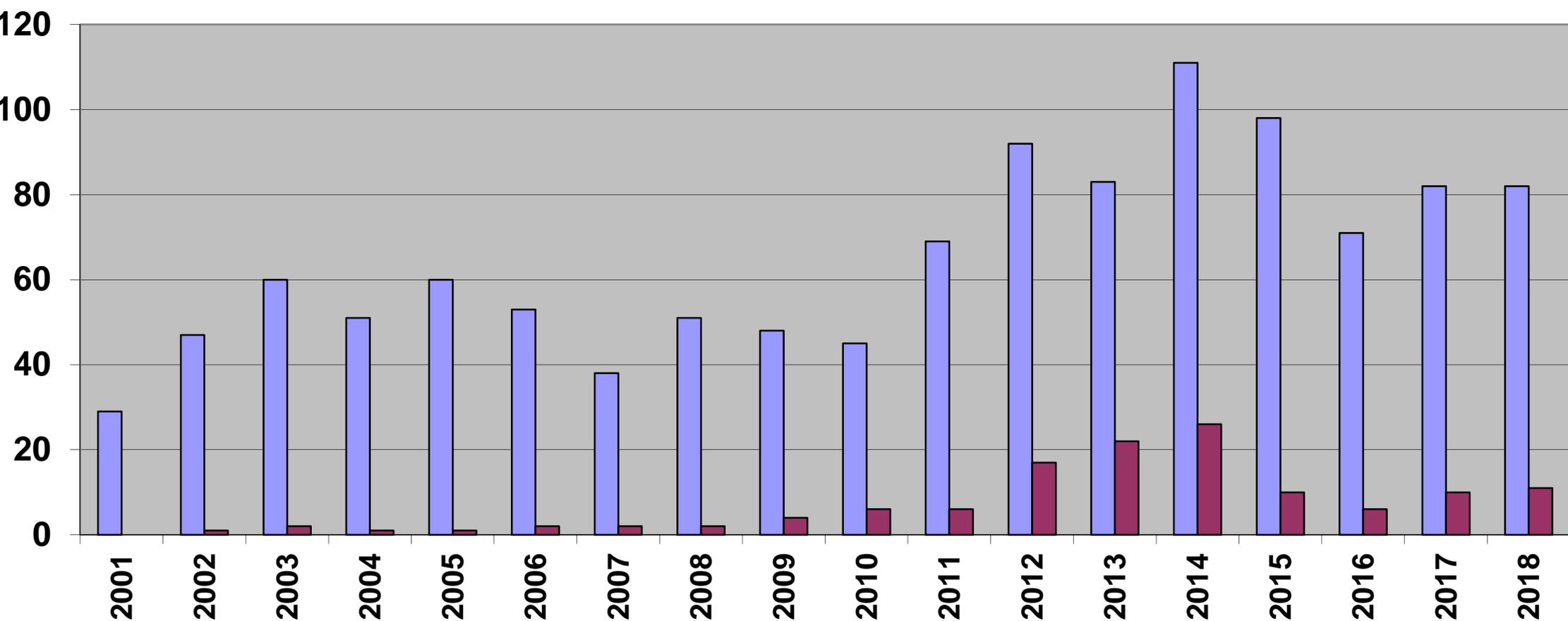
WHO, Global Tuberculosis Report 2018

TB-MDR et CNR-MyRMA

Les souches des cas de tuberculose MDR (R à isoniazide et rifampicine) diagnostiqués en France sont confiées par les laboratoires de bactériologie au CNR-MyRMA pour expertise et surveillance épidémiologique.

La quasi-totalité des souches MDR sont effectivement reçues au CNR-MyRMA

Souches *M.tuberculosis* MDR-XDR reçues au CNR-MyRMA 2001-2018 (toute la France)



Matériels et Méthodes

1 souches de *M. tuberculosis* MDR 2006 – 2018

- Phénotype/Génotype de résistance

RU-VNTR

- Technique standardisée 24 loci (*Supply P, J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12)*)
- 4 MIRU complémentaires (*Allix-Béguet C, J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1)*)

GS

- 273 souches
 - ✓ 65 MDR (dont 5 XDR) de 2018
 - ✓ 54 non MDR de 2018 (différents clades = témoins)
 - ✓ 114 (67 MDR et 47 non MDR) de 2017
 - ✓ 40 MDR de 2004-2016
- Séquençage pair-end Illumina NextSeq500
- Assemblage Galaxy (plateforme SeqOIA APHP) et BioNumerics

RESULTATS (1) : résistance

Proportion de souches XDR (R aux fluoroquinolones (FQ) et injectables (IN)) parmi les souches MDR :

5% de 2006 à 2008

27% en 2014

10-13% depuis 2015

Résistance des souches MDR aux antituberculeux récents :

4% au linézolide (LZ)

6% à la bédaquiline (BQ)

5% au délamanide

Mutations dominantes dans les gènes

***gyrA* (codon 94) pour FQ), *rrs* a1401g pour IN, *rplC* pour LZ et *Rv0678* pour BQ**

RESULTATS (2)

ANALYSE MIRU-VNTR

Lignées phylogéniques des souches MDR

Beijing : 38%
 ... : 20%
 ... : 14%
 Harlem/X : 8%
 Ghana : 6%
 ... : 3%
 URAL : 3%
 CAS-DEHLI : 2%
 Cameroon : 2%
 ... : 4%
M. bovis : 0,3% (3 en 13 ans)
 ... % Beijing :
 ... % en 2006-07
 ... % en 2013-14
 ... % en 2017-18
 ... vague de patients d'ex-URSS
 ... (Géorgie, Russie, Arménie)

Evolution de 2006 à 2018 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en lignes 1, 2 et 3, et en vert lignée 4)

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

Lignées selon le pays de naissance des patients

Maghreb
 Haarlem/X 30% ; L4/nt 27% ; LAM 20%

Zone Ouest
 Ghana 56% ; L4/nt (16%)

Zone Centre :
 L4/nt 27% ; Haarlem/X 18% ; LAM 15%

Zone Est
 L4/nt 5% ; Cameroon 22% ; Haarlem/X 11%

Zone Est
 L4/nt 30% ; Beijing 19% ; Haarlem/X 19%

Asie-Ukraine
 L4/nt 69% ; LAM 16%

Géorgie-Arménie Beijing 82%

Zone Est
 L4/nt 53% ; L4/nt 19% ; CAS-DEHLI 17%

Patients nés en France
 L4/nt 23% ; LAM 21%

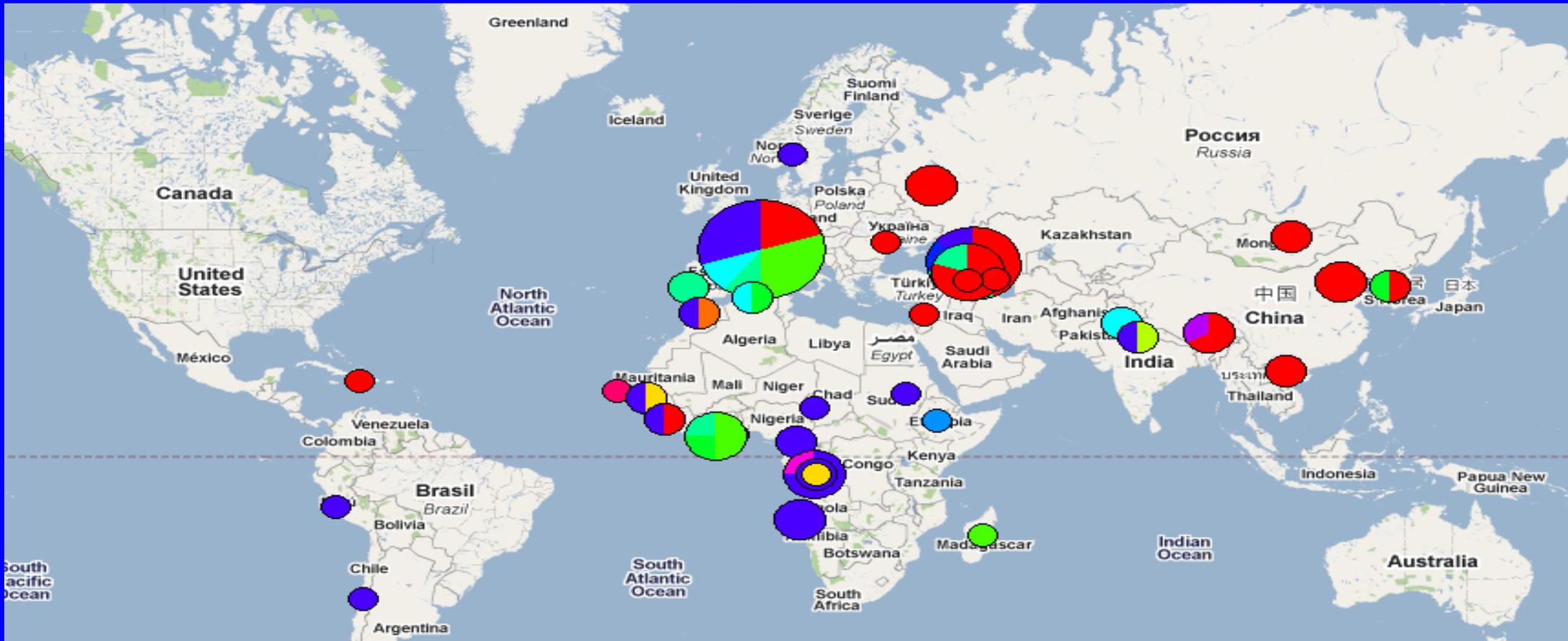
Beijing 21% ; Haarlem/X 18%

Répartition (%) des souches MDR 2006-2018 selon les lignées phylogéniques et les géographiques de naissance des patients

	France	Maghreb	Afriq ouest	Afriq centre	Afriq est	Europ est	Russie Ukrain	Géorgie	Asie centre
N cas MDR-TB	124	41	82	103	28	69	54	155	61
EAI	2				8				
CAS-DELHI	<1				4			1	
Beijing	21	11	9	27	4	22	69	82	84
West Afr	<1		2						
Haarlem-X	18	30	9	18	11	19	2	3	
LAM	21	20	5	15	4	6	16	10	8
L4/nt	23	27	16	13	10	30	6	3	4
Ural-Tur	3				25	14	7	1	4
S	2	12			8	8			
Cameroon	<1		3	9	22	1		<1	
Ghana	4		56	9	4				
Uganda	2			1					
H37Rv	<1			7					
bovis	2			1					

Génotypes des cas de tuberculose MDR en France

Distribution par pays de naissance



T Beijing **Haarlem-LAM**
Cameroon **S**
Dehli

- nés en Afrique : 1/2 T
- nés en Europe est et Asie : 3/4 Beijing

Cas MDR « liés » : typage MIRU-24 loci (+ 4 loci hypervariables) + résistom

- 81 épisodes de cas génétiquement liés (dont 12 XDR)
- très grande majorité : 1 cas index et 1 ou 2 cas 2aires familiaux ou cercle très proche

cas X

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
					2 (Ti) 2 (Mo) 2 (Viet)	3 (Arm)	2 (Ge)	<u>2(Ge)</u> 1(Ge) 1(Gui) 1(Ar) 1(F)	<u>2(Ge/F)</u> <u>2(Ge)</u> <u>2(Ru)</u> <u>2(Ge F)</u>		1(Mo) 1(Ti) 2(F/Ge) 1 (F/Uk) <u>1(Ru/F)</u>	2(F Ge) 2(Ge) 1(F) 2(F/Ge)
		4 (Po)				2 (F)	2 (Ge) 4 (Rdc/F)	1 (RdC)	2 (F)	2(F/Po) (F) 2(Rdc) 1 (Rdc)	<u>1(F/Po/Afr)</u> 2(F) 1(F/Mar)	1(Alg)
n										3(Mar/F) 1(F/Alg)		4 (Poly) 1(Soud) 1(Cam) 1(Soud)
			3 (Co)	2 (Co)	1 (Co)	3 (Alg)	1 (Co) 2 (F)	1 (Se)	2 (Co) 2(Mar) 2(Ro) 2(Ro/Ch)	2(Co) 3(All)		
						2 (Ro)			<u>2(Arm)</u>			1(F)
hi - EAI on , S				2 (Civ)		2 (F) 2 (Ro)		1 (Alg)	2 (Tha)	2(Po/Bre)	1(F/Po) 1(Se) 2(Sd/Som) 1(Alb)	1(Cong) 1(F) 1(F) 1(Pak)

Cas MDR « liés » : typage MIRU-24 loci (+ 4 loci hypervariables) + résistom

Quelques exceptions

Cas milieu professionnel/cercle proche, sur 8 ans : nés en France, Corse ; lignée nt

Cas familiaux /cercle proche, sur 4 ans : R.d.Congo/né en France ; lignée LAM

Episodes Tr.X hospitalière de XDR : 1 cas 2aire à partir cas Géorgie/Russie ; lignée Beiji

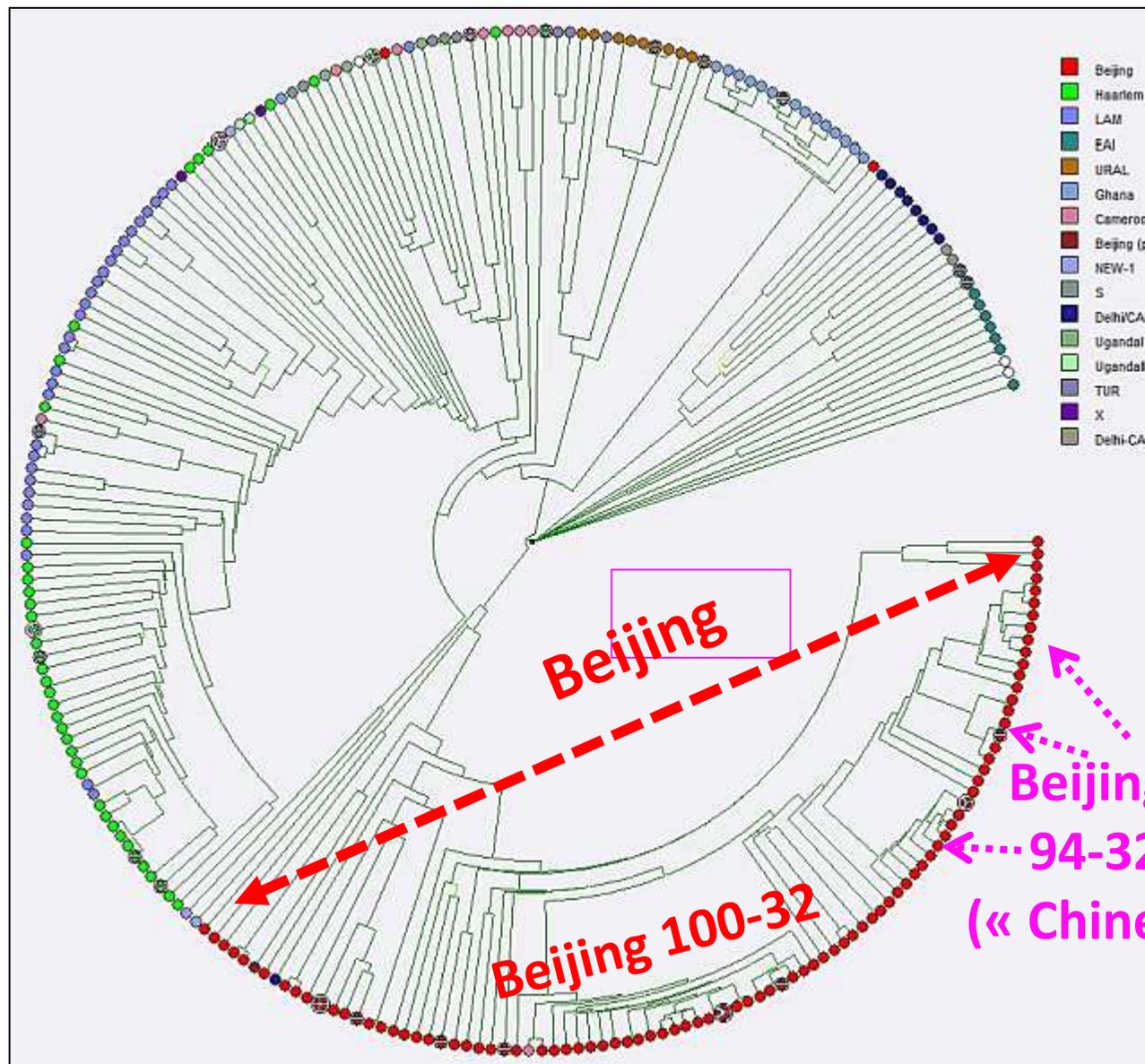
	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17
ng							2(Ge/F) 2(Ge/F)		1(Ru/F)	
					4(RdC/F)	1(RdC)		1(RdC)		
nt)	3(Co)	2(Co)	1(Co)		1(Co)		2(Co)	2(Co)		

RESULTATS (3) : WGS

32 souches MDR/XDR
de 2017-18

WGS différencie des
souches non distinguables
par MIRU

en particulier lignée Beijing
exemple : cluster Beijing de
MIRU-VNTR 100-32
(« Russe »)

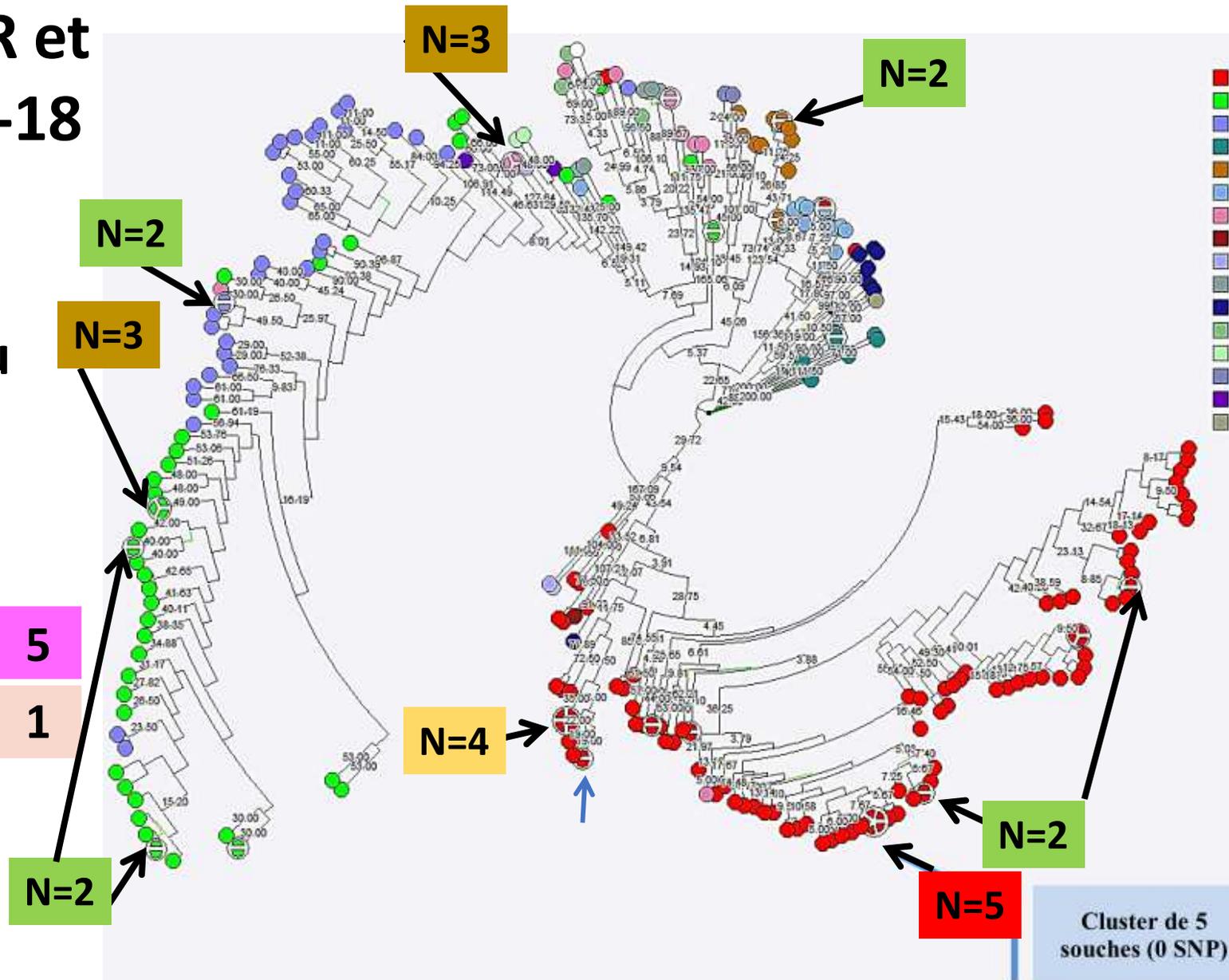


RESULTATS (3) : WGS

2 souches MDR/XDR et
1 non MDR de 2006-18

2 souches ont des
génomomes identiques à au
moins une autre souche
(transmission directe ?)

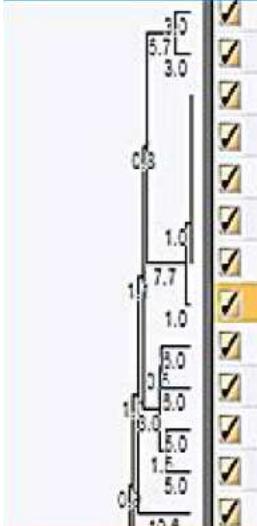
Branches/cluster	2	3	4	5
Clusters	16	4	1	1



RESULTATS (3) : WGS

Souches MDR/XDR du cluster **Beijing CC2 haplotype 100-32**

Groupe de 13 souches au
du cluster
Beijing MIRU 100-32



<input checked="" type="checkbox"/>	1704026363-PIO_S...	Beijing	100-32	6DEA	France	2017	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	1704050205-ALM_R...	Beijing	100-32	6DEA	Georgie	2017	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	170904460301-TL...	Beijing	4737-32	6dea	Georgie	2017	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	171207551601_NA...	Beijing	100-32	6dca	Georgie	2017	XDR
<input checked="" type="checkbox"/>	1809058843-KHUB...	Beijing	100-32	6dea	Géorgie	2018	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	40_S6_L001_R1.fastq	Beijing	100-32		Géorgie	2011	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	NG-7390_22_lib433...	Beijing	100-32		Géorgie	2012	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	1808057528-PIC_S...	Beijing	100-32	6dea	Géorgie	2018	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	1804082684-AVE-...	Beijing	9370-32	6DEA	Arménie	2018	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	NG-7074_49_lib349...	Beijing	100-32		Tchéchénie	2012	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	NG-7074_12_lib338...	Beijing	100-32		Armenie	2006	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	NG-7390_8_lib4331...	Beijing	100-32		Russie	2006	MDR
<input checked="" type="checkbox"/>	NG-7074_33_lib349...	Beijing	100-32			2010	MDR

RESULTATS (3) : WGS

Souches MDR/XDR du cluster **Beijing CC2 haplotype 100-32**

groupe de 13 souches au sein du cluster **Beijing MIRU 100-32**

A.

groupe de 6 souches (dont 1 XDR)
 ≤ 1 SNP
 1 diffère en MIRU (1 locus)

Patients Géorgiens

Période 2011-2018

Résistomes ~ identiques



Chaine de transmission en Géorgie (2011-2012) et en France (2017-2018)

Accession	Strain	Origin	Haplotype	MDR	Year	MDR/XDR
1704026363-PIO_S...	Beijing	France	100-32	6DEA	2017	MDR
1704050205-ALM_R...	Beijing	Georgie	100-32	6DEA	2017	MDR
170904460301-TIL...	Beijing	Georgie	4737-32	6dea	2017	MDR
171207551601_NA...	Beijing	Georgie	100-32	6dca	2017	XDR
1809058843-KHUB...	Beijing	Géorgie	100-32	6dea	2018	MDR
40_S6_L001_R1.fastq	Beijing	Géorgie	100-32		2011	MDR
NG-7390_22_lib433...	Beijing	Géorgie	100-32		2012	MDR
1808057528-PIC S...	Beijing	Géorgie	100-32	6dea	2018	MDR
1804082684-AVE-...	Beijing	Arménie	9370-32	6DEA	2018	MDR
NG-7074_49_lib349...	Beijing	Tchéchénie	100-32		2012	MDR
NG-7074_12_lib338...	Beijing	Arménie	100-32		2006	MDR
NG-7390_8_lib4331...	Beijing	Russie	100-32		2006	MDR
NG-7074_33_lib349...	Beijing		100-32		2010	MDR

Id number	katG315	inhA MTBDRsl	mpoB MTBDRplus	gyrA MTBDRsl	gyrB sea	pnca	rrs MTBDRsl	eis	embB 306
1704026363-PIO	S315T		S531L			D63A			
1704050205-ALM	S315T		S531L	S91P		D63A			
170904460301-TIL	S315T		S531F	D94G		Q141P	-37g>t	M306V	
171207551601-NA	S315T		S531F			Q141P	-37g>t	M306V	
1809058843-KHUB	S315T		S531F			Q141P	-37g>t	M306V	
40-S6	S315T		S531F			Q141P	-37g>t	M306V	
NG-7390-22	S315T		S531F			Q141P	-37g>t	M306V	
1808057528-PIC	S315T		S531F			Q141P	-37g>t	M306V	
1804082684-AVE	S315T		S531L				A1401G		
NG-7074-49	S315T		S531L			Q10H	A1401G		M306I
NG-7074-12									
NG-7390-8									
NG-7074-33	S315T		S531L			V9G			M306V

RESULTATS (3) : WGS

Souches MDR/XDR du cluster **Beijing CC2 haplotype 100-32**

groupe de 13 souches au sein du cluster **Beijing MIRU 100-32**

B.

groupe de 2 souches :
6 SNP, 2017

Géorgie/France

Résistomes ~ identiques

Transmission ??

C.

groupe de 4 souches :

10 à 12 SNP, 2006-2018

Arménie, Tchétchénie, Russie

Résistomes différents

Pas de transmission

Id number	katG315	inhA MTBDRsl	mpoB MTBDRplus	gyrA MTBDRsl	gyrB sea	pnca	rrs MTBDRsl	eis	embB 306
1704026363-PIO	S315T		S531L			D63A			
1704050205-ALM	S315T		S531L	S91P		D63A			
170904460301-TIL	S315T		S531F			Q141P		-37g>t	M306V
171207551601-NA	S315T		S531F	D94G		Q141P		-37g>t	M306V
1809058843-KHUB	S315T		S531F			Q141P		-37g>t	M306V
40-S6	S315T		S531F			Q141P		-37g>t	M306V
NG-7390-22	S315T		S531F			Q141P		-37g>t	M306V
1808057528-PIC	S315T		S531F			Q141P		-37g>t	M306V
1804082684-AVE	S315T		S531L				A1401G		
NG-7074-49	S315T		S531L			Q10H	A1401G		M306I
NG-7074-12									
NG-7390-8									
NG-7074-33	S315T		S531L			V9G			M306V

CONCLUSIONS

4 lignées dominantes dans les cas MDR/XDR reliés : Beijing ; LAM ; Haarlem ; L4-nt
(lignées rares : URAL ; Ghana ; Dehli/CAS ; Uganda ; Cameroon...)

J-VNTR

nombre de grappes de cas reliés bactériologiquement et
épidémiologiquement a évolué : 1 à 2/an en 2006-2009, 5 en 2010-12, 7 en
2013, puis 7 à 14 depuis

l'augmentation du nombre de grappes est due :

- (a) à l'augmentation du nombre de cas MDR
- (b) à l'accumulation des données sur plusieurs années

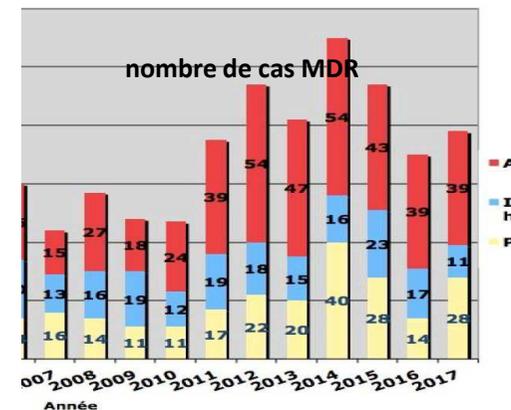
GS :

✓ Résistome :

- parfaite corrélation entre SNP et mutations trouvées par amplification/séquençage Sanger
- alternative aux autres approches génomiques, en identifiant en 1 expérience le résistome
- mais ~ pas à partir des prélèvements (≠ NGS sur amplification multiplexe)

✓ Phylogénie

- > MIRU-VNTR pour identifier des clusters, principalement au sein des souches Beijing, et pour identifier des potentielles chaînes de transmission sur des périodes longues
- ne permet pas d'obtenir les profils MIRU





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



Remerciements

Gerald MILLOT et Sabrina GOUMGHAR (techniciens CNR)

Vincent Enouf (P2M-Pasteur)



Institut Pasteur

Souches *M.tuberculosis* MDR reçues au CNR-MyRMA 2006-2018 (toute la France)

