

Contribution du typage moléculaire à la surveillance de la tuberculose multirésistante en France, 1995-2000

M. C. Gutiérrez, V. Vincent, Centre national de référence des mycobactéries, Institut Pasteur

INTRODUCTION

Le Centre national de référence des mycobactéries réalise l'analyse génétique systématique des bacilles de la tuberculose multirésistants (BT-MR) qui lui sont adressés. Initiée en 1993 [1, 2], cette analyse génomique a été standardisée selon les recommandations internationales en 1995 [3] et entre dans les missions de notre laboratoire en tant que CNR.

L'appellation « multirésistant » correspond aux bacilles résistants à la fois à la rifampicine et à l'isoniazide, les deux antituberculeux majeurs. Le taux de prévalence de multirésistance aux antituberculeux en France est de 0,5 % chez les nouveaux cas et 3,9 % chez les cas déjà traités, avec un taux global de 0,9 % selon les estimations de 1995-96 [4]. Les dernières estimations disponibles montrent un taux global de multirésistance de 0,7 % pour 1998 (cf article du Centre national de référence pour la surveillance des infections à mycobactéries et de leur résistance aux antituberculeux, CNR-SIM, publié dans ce numéro).

La surveillance de la tuberculose multirésistante en France par typage moléculaire a comme objectifs de contribuer à la connaissance de la circulation et de la transmission des BT-MR dans la communauté, à la détection et l'analyse d'infections nosocomiales, au suivi de l'évolution génétique des BT-MR et à la surveillance de familles génétiques comme la famille dite Beijing [1] ; elle s'intègre dans les réseaux de surveillance internationaux mis en place pour la surveillance de la tuberculose multirésistante en Europe.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches bactériennes

L'analyse standardisée initiée en 1995 comprend 164 souches de BT-MR, qui correspondent à 143 malades atteints d'une tuberculose multirésistante dans la période 1995-2000 (tableau 1). L'étude a porté sur les souches transmises à notre CNR pour antibiogramme et typage moléculaire dans le cadre de la surveillance de la tuberculose multirésistante en France, les données épidémiologiques des patients étant recueillies par le CNR-SIM. Le typage moléculaire a permis de confirmer que deux des patients étaient infectés par *M. bovis* et un troisième par *M. africanum*. Pour les patients chez lesquels des BT-MR ont été isolés à plusieurs reprises pendant la même année, l'analyse n'inclut qu'une souche par malade.

Tableau 1

Distribution annuelle des 164 BT-MR inclus dans l'étude de typage moléculaire (ces 164 souches correspondent à 143 patients)

Année	Total des souches typées	Cas BT-MR connus pour la première fois en					
		1995	1996	1997	1998	1999	2000
1995	24	24					
1996	23	4	19				
1997	25	3	3	19			
1998	34	2	0	2	30		
1999	32	1	0	0	3	28	
2000	26	1	0	0	2	0	23

Pour les 11 patients chez lesquels des BT-MR ont été isolés lors de différentes années, l'analyse génétique inclut une souche de BT-MR par an avec un intervalle de six mois minimum. L'évaluation de l'exhaustivité de notre analyse pour les années 1995-1998 montre que l'effectif étudié correspond à la plupart des cas de BT-MR déclarés en France pour la première fois, représentant 94,8 % de ces cas (cf article du CNR-SIM publié dans ce numéro). Pour les années 1999-2000, les données épidémiologiques ne sont pas encore disponibles.

Typage génomique

Le génotypage a été réalisé par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction avec la séquence d'insertion IS6110 (RFLP-

IS6110) et par l'analyse du locus « direct repeat » grâce à la technique dite « spoligotyping ». La méthode RFLP-IS6110 repose sur le polymorphisme de distribution de la séquence d'insertion IS6110 dans le génome. Il s'agit de la méthode la plus discriminante disponible aujourd'hui, qui constitue la méthode de typage de référence de *M. tuberculosis*. La comparaison des profils génomiques permet de reconnaître les souches à profil identique pouvant avoir une origine commune et d'en déduire des groupes de patients épidémiologiquement liés. Le spoligotyping analyse une région unique du génome composée d'un nombre variable de petites séquences répétées disposées en tandem et séparées par des fragments d'ADN de séquence variable. Cette méthode, moins discriminante que le RFLP-IS6110, permet néanmoins d'identifier des familles génétiques de souches (comme la famille Beijing décrite plus loin) et d'établir leur distribution et leur prévalence.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Surveillance des souches successives : patients chroniques et cas de rechute

Pour les 11 patients qui présentaient des souches isolées sur plusieurs années, l'analyse montre un profil identique ou des modifications mineures des profils génomiques (perte ou acquisition d'une copie d'IS6110) pour les isollements d'un même patient indiquant la persistance ou la réactivation de la souche initiale. Sept patients présentaient régulièrement des isollements chaque année (pendant quatre années consécutives pour l'un des patients et pendant trois années consécutives pour deux autres patients). Ces patients qui restent contagieux pendant des années constituent d'importantes sources d'infection de BT-MR pour la communauté, comme le montre la présence de cinq d'entre eux dans des groupes de transmission. Les quatre autres patients, pour lesquels le délai entre les isollements variait de deux ans à cinq ans, correspondent à des cas de rechute.

Pour deux patients inclus dans l'étude, des souches antérieures initialement sensibles à la rifampicine ont pu être étudiées. Le typage moléculaire a montré un profil génétique identique pour ces souches séquentielles, indiquant qu'il s'agit bien de sélection de résistance et non de nouvelles infections.

En dehors de la période d'étude, nous avons mis en évidence en 2001 un cas de nouvelle infection chez un malade qui en 1997 avait été traité avec succès pour une infection à BT-MR. La souche du deuxième épisode était sensible à tous les antituberculeux et présentait un profil génomique distinct de celui de la première souche. Ce cas doit attirer l'attention sur la possibilité de réinfection. Seul le typage moléculaire permet la démonstration de ces cas rares.

Surveillance des groupes des BT-MR

La comparaison des profils génomiques a été faite à l'aide du logiciel Gel Compar 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Les souches ont été classées en groupes quand le nombre de copies d'IS6110 et la taille des bandes correspondantes étaient identiques. L'analyse a regroupé 42 souches (soit 30 %) en 19 groupes. Les 101 autres souches présentaient des profils génomiques uniques. Ce pourcentage de 30 % de souches incluses dans des groupes est proche de celui obtenu lors de l'étude menée sur les cas diagnostiqués dans divers hôpitaux de la région parisienne en 1995 ou en Gironde en 1997, et reflète une hétérogénéité génétique comparable [5, 6].

La taille des groupes est réduite et chacun représente un petit effectif de patients (16 groupes comportent deux souches, deux groupes trois souches et un groupe quatre souches). Dans huit des 19 groupes, le diagnostic de tuberculose des patients impliqués était porté la même année ou sur deux années consécutives. Cependant dans les 11 autres groupes, le délai pouvait aller jusqu'à quatre ans, ce qui montre l'intérêt de mener ces études de typage moléculaire sur plusieurs années, au risque de ne pas mettre en évidence la plupart des groupes. La durée du délai de diagnostic séparant les cas groupés est néanmoins

un facteur limitant pour établir les liens épidémiologiques entre les patients.

Le groupe le plus large comprend quatre souches Beijing, isolées de quatre patients d'origine subsaharienne. Une transmission intra-familiale a été démontrée pour un groupe de trois patients. Pour l'autre groupe impliquant trois cas, l'appartenance des trois patients au même groupe social (patients d'origine sub-saharienne demeurant en région parisienne, en situation de précarité) suggère un lien épidémiologique probable. L'origine géographique commune (lieu de naissance, résidence actuelle) s'avère aussi comme le principal facteur suggérant des liens épidémiologiques pour les groupes à deux patients, identifié notamment pour des patients résidant à la Réunion ou dans le département du Nord, et pour des patients d'origine asiatique ou portugaise.

Deux exemples soulignent l'intérêt de constituer des banques de données internationales qui permettent de suivre la diffusion des souches au-delà des frontières. Ainsi, un groupe de deux souches a été identifié avec le même profil que celui d'une souche responsable au Portugal d'une épidémie de tuberculose multirésistante dans les années 1996-97. Un des deux malades du groupe provenait de ce pays où il avait déjà eu un diagnostic de tuberculose en 1991. La souche isolée au Portugal chez ce patient, directement transmise de Lisbonne à notre CNR pour analyse comparative, montre également un profil identique à celui de la souche de 1991. De plus, deux souches identiques de la famille Beijing ont été isolées chez deux patients français qui, dans les mois précédant la maladie, avaient voyagé au Vietnam.

Trois épisodes de transmission nosocomiale ont été décrits précédemment en France et confirmés par typage moléculaire. Le premier épisode en 1989-1992 impliquait six patients atteints de SIDA et un membre du personnel soignant, le deuxième en 1993-1994 impliquait deux patients atteints de SIDA, et enfin le dernier épisode en 1995 concernait deux patients qui avaient fréquenté la même consultation hospitalière en 1992 [2, 3]. Aucun autre cas de transmission nosocomiale n'a été détecté dans l'enquête 1995-2000, ce qui souligne la qualité et l'efficacité de la prévention de la transmission de la tuberculose multirésistante au niveau du milieu hospitalier français.

Surveillance des contaminations de laboratoire et de fibroscope

Cinq souches BT-MR ont été à l'origine de cinq épisodes de contamination de laboratoire et ont concerné les prélèvements de sept patients. Une de ces souches a contaminé trois prélèvements et les quatre autres ont chacune contaminé un prélèvement. Quatre de ces contaminations ont impliqué des prélèvements provenant de patients qui n'avaient pas la tuberculose. Dans un autre cas, le prélèvement contaminé provenait d'un patient atteint de tuberculose mais porteur d'une souche sensible, comme cela a été vérifié postérieurement avec d'autres prélèvements où les bacilles isolés étaient sensibles à tous les antituberculeux. Une souche BT-MR a été aussi à l'origine d'un épisode de contamination de fibroscope contaminant les prélèvements de deux autres patients. Ces contaminations de prélèvements par des bacilles de la tuberculose exogènes peuvent générer de faux diagnostics de tuberculose, conduire à l'utilisation d'antibiotiques de deuxième ligne sans nécessité et retarder le diagnostic d'autres pathologies. Généralement les bactériologistes soupçonnent rapidement la survenue de ces épisodes de contamination que le typage moléculaire contribue à confirmer ou infirmer grâce à la capacité de la séquence d'insertion IS6110 à différencier les souches d'origine différente. Le typage génomique des BT-MR avait déjà mis en évidence des contaminations dans les enquêtes précédentes. L'enquête actuelle montre la persistance du problème et la difficulté de sa prévention.

Surveillance des souches Beijing

Les souches Beijing sont un groupe génétique de *M. tuberculosis* initialement isolé dans en Chine à Beijing et retrouvé dans plusieurs pays du monde. Ainsi, cette famille de souches a été associée à la transmission de BT-MR à Cuba, en Allemagne, Russie, Estonie ainsi qu'aux Etats-Unis, où une épidémie due à la souche dite « W », un variant du génotype Beijing, a touché plus de 250 personnes. L'infection nosocomiale diagnostiquée en France en 1993-1994 impliquant deux patients était due à une souche W, le cas index étant revenu des Etats-Unis pour soigner sa tuberculose en France (2). Des études suggèrent que la famille Beijing a émergé récemment et serait en expansion dans le monde. Pendant les cinq premières années de la surveillance (période 1995-1999), la présence des souches BT-MR appartenant à la famille

Beijing était sporadique en France, avec deux-trois cas par an. L'année 2000 est marquée par une augmentation substantielle avec sept patients sur 23. Aucune des 20 souches Beijing isolées pendant ces six ans n'avait le profil de la souche épidémique W. Parmi l'ensemble des 19 groupes de souches identifiés dans l'étude, cinq correspondaient à des souches de la famille Beijing. Sur les 20 patients infectés par une souche Beijing, 13 étaient inclus dans un de ces groupes de transmission. L'association préférentielle des souches Beijing à des groupes de transmission est statistiquement significative ($P < 0,001$ pour un intervalle de confiance de 95%), ce qui conforte l'hypothèse d'une plus grande transmissibilité de cette famille génétique (7). La majorité des patients avec des souches Beijing était d'origine étrangère et provenait principalement des pays asiatiques (six cas) mais cinq patients étaient nés et résidaient en France.

Résistance des BT-MR aux antibiotiques de première et deuxième ligne

Les souches des 143 patients ont fait l'objet d'un antibiogramme comprenant les antibiotiques de première et de deuxième ligne. Les 2/3 des souches étaient résistantes au moins à un autre antibiotique de première ligne (tableau 2). La résistance globale des souches BT-MR à l'éthambutol était de 36,4 %, au pyrazinamide de 16,1 %, à la streptomycine de 49,0 % mais de seulement 3,5 % à l'amikacine. Quand aux fluoroquinolones, la résistance était de 16,1 %. Il est important de souligner que cinq souches BT-MR qui restaient sensibles aux autres antituberculeux majeurs présentaient comme seule résistance associée celle aux fluoroquinolones.

Tableau 2

Résistance des BT-MR aux autres antibiotiques majeurs pendant les années 1995-2000 en France

Résistance à*	nombre	(%)
INH + RMP seuls	38	(32,3)
INH + RMP + au moins 1 autre antibiotique majeur :		
SM	26	(22,4)
EMB	11	(9,5)
PZA	6	(5,2)
SM + EMB	18	(15,5)
SM + PZA	7	(6,0)
EMB + PZA	3	(2,6)
SM + EMB + PZA	7	(6,0)
Total	116	(100,0)

* L'analyse a été déterminée avec les résultats de 116 souches pour lesquelles tous les antituberculeux de première ligne (INH, RMP, SM, EMB, PZA) avaient été testés

CONCLUSION

La persistance tout au long de l'enquête d'incidents de contaminations de laboratoire ou de fibroscope par des bacilles de la tuberculose exogènes aux prélèvements des patients démontre la nécessité de maintenir le typage systématique des souches BT-MR. Le typage génomique s'avère ainsi un outil pertinent pour s'assurer de la validité des données de surveillance en excluant de l'analyse les cas faussement positifs.

L'étude du typage moléculaire des souches BT-MR isolées en France ces six dernières années montre que 30% des cas sont inclus dans des groupes. La plupart de ces groupes sont constitués de deux patients seulement. La faible incidence, la diversité génétique des souches et le petit effectif des groupes de transmission soulignent une bonne prise en charge de la plupart des patients et un contrôle globalement efficace de la transmission. De plus, aucune nouvelle infection nosocomiale n'a été mise en évidence, soulignant l'efficacité de la prise en charge au niveau hospitalier.

Néanmoins, il persiste quelques patients chroniques qui peuvent contribuer à l'extension de la maladie dans la communauté et qui méritent une surveillance particulièrement attentive. Il faut rappeler que les antibiotiques de seconde ligne sont moins efficaces, donnent plus d'effets secondaires que les médicaments antituberculeux majeurs et doivent être prescrits pendant un minimum de 18 mois. Les malades ont donc besoin d'un suivi médical étroit ainsi que d'un soutien psychologique permanent. Enfin, l'augmentation des cas de tuberculose multirésistante dus à des souches de la famille Beijing semble indiquer que ce groupe génétique de bacilles est en expansion

en France, et devrait faire l'objet d'une attention particulière dans les années à venir. Leur détection rapide pourrait être envisagée par le typage systématique des souches isolées de patients ayant effectué des voyages dans des régions de haute prévalence de souches Beijing (Sud-Est asiatique, Europe de l'Est) ou isolées de patients issus de l'immigration de ces régions.

Les résultats de cette étude font partie d'une base de données internationale en construction dans le cadre d'une action concertée de la communauté européenne (EU-project QLK2-CT-2000-00630), pour la surveillance de la tuberculose multirésistante en Europe.

RÉFÉRENCES

- [1] Decludt B, Schwoebel V, Haeghebaert S, Vincent V, Clément F, Perronne C, et al. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants en 1993. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1994(50) : 235-236.
- [2] Schwoebel V, de Benoist AC, Decludt B, Haeghebaert S, Vincent V, Torrea G, et al. Résultats de la surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants en 1994. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1996(8) : 33-34.
- [3] Grosset J, Trystram D, de Benoist AC, Schwoebel V, Vincent V, Gutierrez MC, et al. La tuberculose à bacilles multirésistants en France en 1995. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1998(13) : 53-54.
- [4] Trystram D, Robert J, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Grosset J. Infections à Mycobactéries et résistance aux antituberculeux. *Bulletin Epidémiologique Annuel* 1999 ; *Epidémiologie des maladies infectieuses en France. Situation en 1997 et tendances évolutives récentes. Réseau national de Santé Publique, Saint-Maurice, France* : 119-121.
- [5] Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, et al. Molecular fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):486-92.
- [6] Elia-Pasquet S, Dabis F, Texier-Maugien J, Dessus-Babus S, Meynard J, Bouiges M, et al. Transmission de la tuberculose en Gironde, approche épidémiologique par l'analyse génomique du Mycobacterium tuberculosis. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2000 ; 48(2) : 127-36.
- [7] Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, Garcia I, Cabrera P, et al. Epidemiological evidence of the spread of a Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(7):1165-70.