

## **Organisation de la lutte antituberculeuse en Guyane**

Les centres hospitaliers de Cayenne (CHAR), Kourou (CHK) et Saint-Laurent du Maroni (CHOG) sont en première ligne pour l'évaluation clinique initiale et la mise sous traitement. Le CHAR et le CHOG disposent du système GeneXpert (Cepheid) qui effectue des tests PCR permettant de détecter simultanément la présence du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et la résistance à la rifampicine (détection des mutations de résistances à la rifampicine, qui sont des marqueurs d'une souche MDR (multi-resistant drug)). La Croix Rouge Française organise les enquêtes autour des cas, la prise en charge et le suivi des traitements pour les patients à la sortie de l'Hôpital. L'Agence Régionale de Santé (ARS) surveille les Déclarations Obligatoires, supervise et soutient le programme de lutte contre la tuberculose. L'Institut Pasteur détient le monopole du diagnostic bactériologique direct, de la mise en culture des prélèvements et du rendu des antibiogrammes de première ligne en Guyane. Cette place a été confirmée dans le rapport de la mission d'évaluation du programme de lutte contre la tuberculose en Guyane (L'Union, Mai 2019) mandatée par l'ARS en 2018 pour faire face à la recrudescence des cas de tuberculose.

## **La démarche diagnostique du laboratoire**

L'activité du laboratoire des mycobactéries est suivie par un biologiste médical, Ph Biol Magali Dodémont arrivée le 16/08/2021 et la partie technique du diagnostic est prise en charge par 2 technicien équivalent temps-plein (ETP).

Le laboratoire s'est progressivement modernisé pour se mettre en conformité avec la démarche diagnostique de référence ainsi qu'avec la norme ISO15189. Le laboratoire est situé dans le laboratoire P3 du vectopôle (déménagement en 2016) et dispose des automates suivants : deux BD BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> 960 (Becton-Dickinson) pour la mise en place de cultures en milieu liquide (achat en 2012 et 2014), d'un colorateur automatisé RAL Stainer® (RAL Diagnostics) pour la coloration Ziehl-Neelsen des lames d'examen direct (achat 2015). Le laboratoire a renouvelé son accréditation COFRAC pour l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis* par le test rapide BD MGIT<sup>TM</sup> TBc identification test (TBc ID; Becton Dickinson) ainsi que pour la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide pour la détection de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux anti-tuberculeux de première ligne (streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide) en utilisant le BD BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> lors de l'audit COFRAC d'octobre 2021.

Notre démarche diagnostique de référence pour la recherche de *Mycobacterium tuberculosis* ou de mycobactéries non tuberculeuse (NTM) (ou mycobactéries atypiques) est la suivante :

### Examen initial

Examen direct (ED) microscopique sur le prélèvement avant décontamination et concentration pour mise en évidence des BAAR (Bacilles acido-alcool-résistants), délai de rendu inférieur à 2 jours ouvrés. L'examen est réalisé en utilisant une coloration de Ziehl-Neelsen (non fluorescente).

### Mise en culture:

Pour chaque prélèvement traité, un milieu liquide (BD BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton-Dickinson) et un milieu solide (Lowenstein-Jensen (LJ), Bio-Rad) sont ensemencés et cultivés à 37°C pendant respectivement 42 jours et 60 jours. Un tube LJ supplémentaire est ensemencé et cultivé à 30°C pour les prélèvements cutanés. L'utilisation de milieux liquides dans un automate de culture (BD BACTEC™ MGIT™) permet de raccourcir le délai moyen de pousse des mycobactéries à 10-15 jours par rapport aux cultures en milieu solide.

### Identification

Le laboratoire utilise un test de détection rapide de l'antigène MPT64 à partir des cultures positives qui, en quelques minutes, oriente vers le complexe *Mycobacterium tuberculosis*. En cas de positivité pour l'antigène MPT64 (spécifique du complexe *tuberculosis*), les échantillons sont envoyés au laboratoire CERBA pour confirmation de l'identification (PCR + hybridation Hain Lifescience). Si l'antigène MPT64 est négatif, une MNT est suspectée et la souche envoyée au laboratoire Cerba pour identification à l'aide des tests GenoType Mycobacterium CM/AS (PCR + hybridation; Hain Lifescience). La recherche de *M. ulcerans* par PCR sur prélèvement est envoyée au CNR.

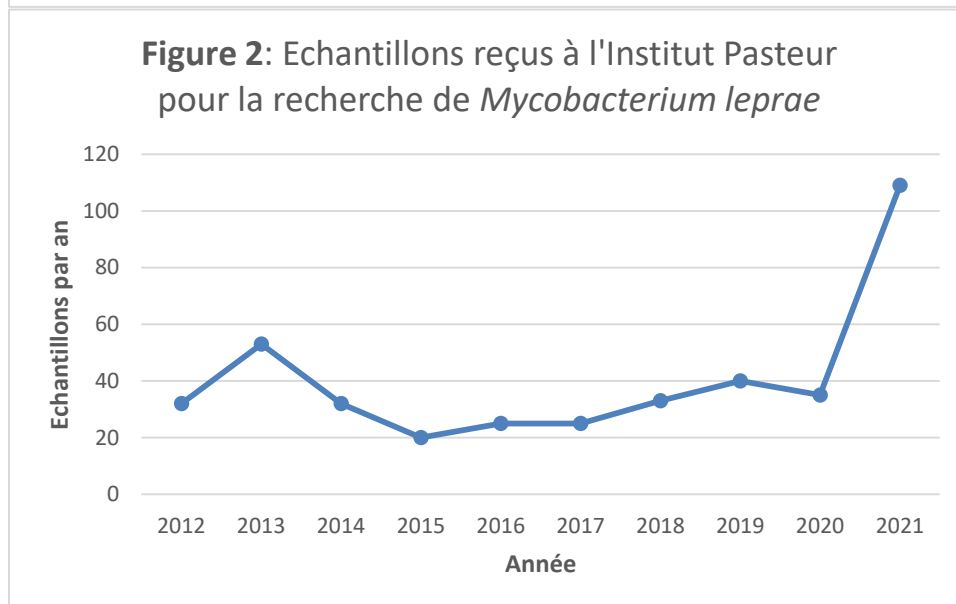
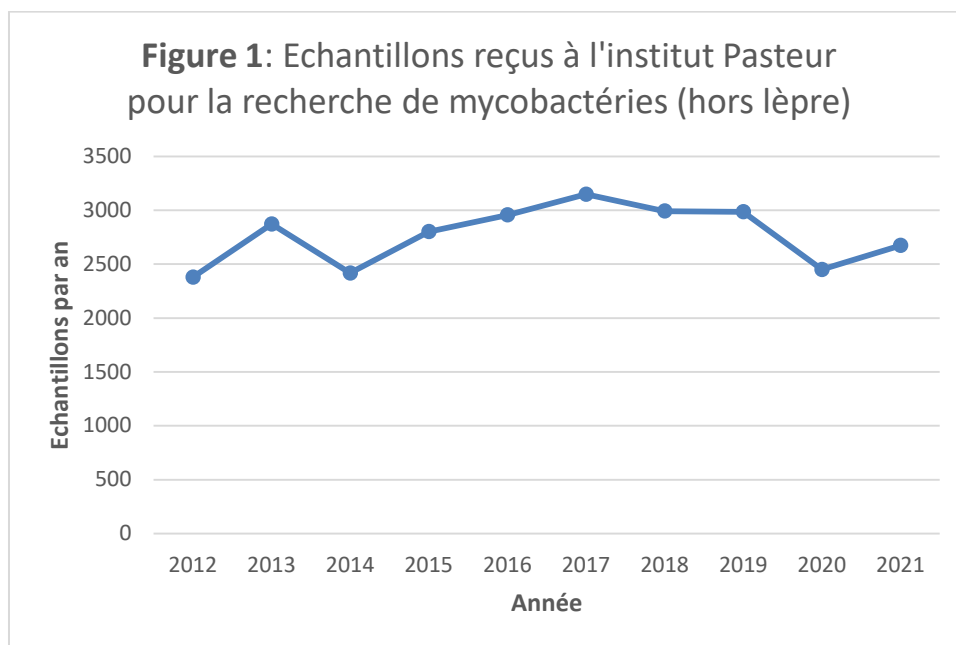
### Antibiogramme

Les antibiogrammes de première ligne (Streptomycine, Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol (SIRE) et Pyrazinamide (PZA)) sont réalisés avec les automates BD BACTEC™ MGIT™ en milieu liquide sur la première série de prélèvements positifs pour *M. tuberculosis*. Si une résistance est détectée, elle est contrôlée en milieu liquide avant d'être envoyée au CNR des Mycobactéries en métropole pour caractérisation moléculaire (DeepLx®Myc-TB).

Les antibiogrammes de seconde ligne pour *M. tuberculosis* et les mycobactéries atypiques sont transmis au CNR à Paris.

## L'activité de diagnostic au laboratoire

Le volume d'activité du laboratoire en 2021 est de 2673 échantillons pour la recherche de mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques) et 109 échantillons pour la recherche de l'agent infectieux responsable de la lèpre, *Mycobacterium leprae*. Le volume d'activité est en augmentation par rapport à 2020 (Figure 1 et 2), avec une forte augmentation pour la recherche de *M. leprae*.



## Les échantillons reçus au laboratoire en 2021

La majorité (77%) des prélèvements reçus sont d'origine respiratoire (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons reçus pour la recherche de mycobactéries.

Type de prélèvement	Echantillons	
	n=	(%)
Expectoration	1647	61.6%
Tubage	239	8.9%
Urine	311	11.6%
Autres Respiratoires	169	6.3%
Biopsies	72 (53 biopsies cutanées)	2.7%
Liquides de ponction (Asc., Pleu., ...)	149	5.6%
Moelle	21	0.8%
Divers (Pus, abcès, ganlion ...)	65	2.5%
<b>Total</b>	<b>2673</b>	<b>100,0%</b>

En 2021, 431 cultures étaient positives (16%).

### M. tuberculosis cplx

Nous avons identifié 69 patients positifs pour la présence du complexe *M. tuberculosis*. Six patients avaient des antécédents de *M. tuberculosis* cplx à l'Institut Pasteur de la Guyane les années précédentes. *Mycobacterium bovis* BCG a été isolé chez un jeune enfant né le 25/04/2021 (adénite post vaccination BCG). Le test MPT64 était négatif et la souche résistante au pyrazinamide (résistance naturelle). Les souches du vaccin BCG présentant une délétion RD2 ne sécrètent pas de MPT64. Les isolats de culture provenant d'infections dues à ces souches peuvent être identifiés à tort comme des mycobactéries non tuberculeuses.

Le sexe-ratio est de 1.2 avec 37 hommes (53.6%) pour 32 femmes (46.4%). L'âge médian est de 42 ans (Tableau 2).

### Mycobactéries atypiques

Trente-six patients étaient positifs pour une mycobactérie atypique (NTM) (Tableau 3). Vingt-cinq patients avaient un seul prélèvement positif pour NTM. Onze patients avaient plusieurs prélèvements positifs pour NTM : huit chez lesquels la même NTM a été isolée et trois patients chez lesquels deux NTM différentes ont été isolées. Un de ces trois patients était également positif pour *M. tuberculosis* cplx.

**Tableau 2 : Données démographiques des nouveaux cas de tuberculose**

Année	2018	2019	2020	2021
Age moyen (extrêmes)	43 ans (0*-78)	37 ans (0**,-76)	34 ans (21-64)	42 ans (1-88)
F (%)	22 (35%)	31 (48%)	17 (34%)	32 (46.4%)
M (%)	40 (65%)	33 (52%)	33 (66%)	37 (53.6%)
<b>Total (n=)</b>	<b>62</b>	<b>64</b>	<b>50</b>	<b>69</b>

Nous avons réalisé 81 antibiogrammes pour l'année 2021. Quatre patients présentaient une mono-résistance à l'isoniazide et trois patients (dont une mère et sa fille) présentaient une mono-résistance à la rifampicine. La mutation D435Y dans le gène *rpoB* a été identifiée par séquençage au CNR. (**Tableau 4**). Cette mutation (dite 'disputed mutation') confère un faible niveau de résistance à la rifampicine chez *M. tuberculosis* et peut ne pas être détectée par les méthodes phénotypiques, comme l'antibiogramme réalisé sur le MGIT. L'antibiogramme phénotypique est interprété 'S' (Sensible), alors que le test génotypique (GeneXpert MTB/RIF ULTRA) montre une résistance à la rifampicine. Résistance qui a été confirmée par le CNR.

Dix patients ont eu deux antibiogrammes et un patient a eu trois antibiogrammes. La répétition des antibiogrammes est expliquée soit par des prélèvements de nature différente positifs (exemple : crachat et urine), soit par un temps de négativation de culture > 2mois. Chez un patient, seul le pyrazinamide a donné un résultat, alors que les quatre autres antibiotiques (SIRE) n'ont donné aucun résultat (échec) malgré la répétition de l'antibiogramme.

**Tableau 3 : Données descriptives du nombre de cas de *M. tuberculosis* détectés (2017 à 2021)**

Analyses effectuées	2017	2018	2019	2020	2021
<b>Nombre de prélèvements</b>	3147	2988	2974	2462	2673
<b>Patients positifs pour :</b>					
Mycobactéries atypiques	42	45	38	20	36
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MT)	<b>74</b>	<b>62</b>	<b>64</b>	<b>69</b>	<b>69</b>
<b>Phénotype de résistance des souches de MT</b>					
<b>Souches multi-résistantes :</b>					
Résistance INH et RIF	0	0	0	0	0
Résistance STR et INH	0	1	0	0	0
<b>Souches mono résistantes :</b>					
Isoniazide	3	2	0	4	4
Rifampicine	0	1	0	0	3
Streptomycine	1	0	0	0	1
Pyrazinamide	0	1	1	0	0
Ethambutol	ND	0	0	0	0
<b>Proportion de souches avec au moins une résistance</b>	<b>5.4 %</b> (4/74)	<b>8.1%</b> (5/62)	<b>1.6%</b> (1/64)	<b>5.8%</b> (4/69)	<b>11.6%</b> (8/69)

**Tableau 4: Caractéristiques des patients résistants aux antibiotiques en 2021**

Patient (dossier)	DDN	Sexe	Résistance	Prélèvement	Génotype (CNR)
F1123093	01/06/1978	M	Isoniazide	Ponction (liquide collection dorsale)	Mutation S315T dans <i>katG</i>
F0424019	02/10/1990	F	Isoniazide	Crachat	Mutation -17 G/T dans le promoteur <i>inhA</i>
F0119250	28/08/1940	M	Isoniazide	Crachat	Mutation -15 C/T dans le promoteur <i>inhA</i>
F0224162	02/10/1993	M	Isoniazide	Crachat	Mutation -17 G/T dans le promoteur <i>inhA</i>
F1120008	15/01/1979	M	Rifampicine	Crachat	Mutation D435Y <i>rpoB</i>
F0423207	08/06/1987	F	Rifampicine	Biopsie colon	Mutation D435Y <i>rpoB</i>
F0813029	09/11/1961	F	Rifampicine	Crachat	Mutation D435Y <i>rpoB</i>
F0201147	06/11/1975	M	Streptomycine	Crachat	Envoyé au CNR qui n'a pas fait la recherche de résistance, car ATB plus utilisé en routine

Phénotype : technique d'identification par culture bactérienne en présence d'antibiotique (culture liquide à l'IPG, solide au CNR) ; Génotype : caractérisation génétique des mutations et polymorphismes.

Quatre souches de mycobactéries atypiques (*M. fortuitum*, *M. avium*, *M. intracellulare* et *M. abscessus cplx*) représentent plus de la moitié (77%, 43/56) des isolats. Davantage de mycobactéries atypiques ont été identifiées en 2021 par rapport aux années précédentes, car les critères microbiologiques de l'ATS et l'IDSA pour le diagnostic d'infection respiratoire à mycobactéries recommandent l'isolement d'une même mycobactérie atypique dans deux expectorations indépendantes. Nous avons donc mis en place l'identification des mycobactéries atypiques chez un même patient sur au minimum deux prélèvements respiratoires.

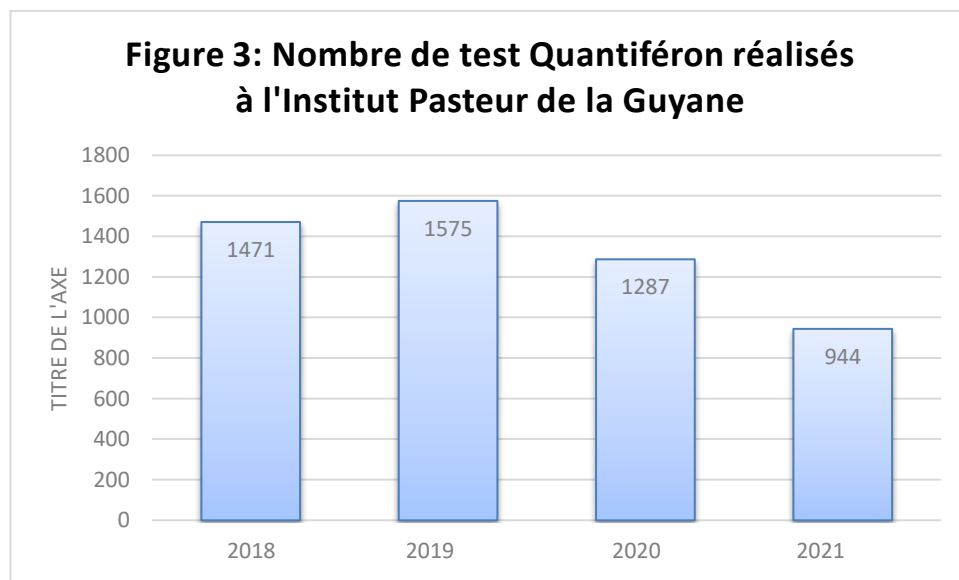
**Tableau 5 : Caractéristiques des souches de mycobactéries atypiques identifiées (Cerba, CNR)**

Souches atypiques	2018	2019	2020	2021
<b>Nombre patients</b>	<b>42</b>	<b>31</b>	<b>18</b>	<b>36</b>
<i>M. intracellulare</i>	7	8	3	9 (8 patients)
<i>M. lente non chrom.</i>	6	7	0	3 (3 patients)
<i>M. abscessus cplx</i>	7	5	1	8 (5 patients)
<i>M. lente chrom.</i>	1	5		3 (3 patients)
<i>M. fortuitum</i>	3	4	6	12 (9 patients)
<i>M malmoense/hemophilum</i>	0	3	0	0
<i>M. avium</i>	7	2	4	14 (4 patients)
<i>M. scrofulaceum</i>	0	2	0	1
<i>M. interjectum</i>	0	1	0	0
<i>M. rapide chrom.</i>	0	1	0	0

<i>M. gordonnae</i>	4	0	2	1
<i>M. szulgai</i>	1	0	1	0
<i>M. lentiflavum</i>	1	0	0	1
<i>M. marinum</i>	1	0	0	1
<i>M. simiae</i>	1	0	1	0
<i>M. genavese</i>	1	0	0	0
<i>M. ulcérans</i>	0	0	0	1
<i>M. mucogencium</i>	0	0	1	0
<i>M. rapide non chrom.</i>	1	0	0	1
<i>M. intermedium</i>	0	0	0	1
<i>Non identifiées</i>	4	0	0	0
<b>Total souches</b>	<b>45</b>	<b>38</b>	<b>19</b>	<b>56</b>

### Tuberculose latente

944 tests Quantiféron® pour la détection de l'infection tuberculeuse latente ont été effectués en 2021 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). 141 tests étaient positifs (14,9%). La diminution du nombre de test s'explique par l'arrêt de l'analyse le 30/10/2021.



## Faits marquants en 2021

- Arrivée d'une nouvelle biologiste en Août 2022.
- Reprise de l'activité suite à un ralentissement en 2020 expliqué par la pandémie de SARS CoV2.
- Renforcement de la collaboration avec les centres hospitaliers, notamment le CHAR pour échange de résultats des PCR *M. tuberculosis*.
- Renforcement des interactions avec la CRF, les équipes d'infectiologie et pneumologie du CHAR/CHOG
- Pénurie mondiale de certains réactifs nécessaires à la mise en culture en milieu liquide (Becton Dickinson)
- AUDIT COFRAC avec renouvellement de l'accréditation pour les antibiogrammes aux anti-tuberculeux de 1ère ligne et à l'identification rapide du complexe *M. tuberculosis* par test antigénique MPT64
- Fermeture 1 semaine pour maintenance du LSB3 et des automates BACTEC et RAL-STAINER
- Arrêt de l'activité du LBM avec sous-traitance de l'analyse Quantiféron au laboratoire privé Eurofins

## Perspectives en 2022

- Poursuite de l'accréditation du laboratoire des Mycobactéries selon la norme ISO15189 :
  - Examen direct et Culture de mycobactéries
- Départ du Dr Magali Dodémont et arrivée du Dr Sophie Baron pour la remplacer. Le Dr Sophie Baron développera de nouvelles analyses liées à son expertise dans le domaine des mycobactéries (génotypage).
- Changement de la société prestataire chargée de la maintenance du laboratoire P3 des mycobactéries.

*Rapport rédigé le 25/06/2022 par le Magali Dodémont, Pharmacien Biologiste, Responsable du laboratoire de des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Guyane depuis le 16/08/21.*