

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 de mutations sur 81 pb du gène *rpoB* conférant une résistance à la rifampicine). La Croix Rouge Française (CLAT pour la Guyane) organise les enquêtes autour des cas, la prise en charge et le suivi des traitements pour les patients les plus précaires, après leur 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 gérée par un biologiste médical et par 3,5 équivalents temps-plein techniciens (ETP).

Le laboratoire s'est progressivement modernisé pour se mettre en conformité avec la démarche diagnostique de référence ainsi qu'avec la norme NF EN ISO 15189. Le laboratoire est situé dans le laboratoire NSB3 du vectopôle (déménagement en 2016) et dispose des automates suivants : deux BD BACTECTM MGITTM 960 (Becton-Dickinson) pour l'incubation et la détection des 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 MGITTM 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 BACTECTM MGITTM lors de l'audit COFRAC d'octobre 2021. Il est en cours d'accréditation pour les examens directs et la culture en milieu liquide et solide.

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 après décontamination et concentration pour mise en évidence des BAAR (Bacilles acido-alcoolo-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, une culture en milieu liquide (BD BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton-Dickinson) et une culture en 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 permet de distinguer les espèces appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* des autres mycobactéries. 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 (Deeplex ®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 2022 est de 2101 échantillons pour la recherche de mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques) et 32 échantillons pour la recherche de l'agent infectieux responsable de la lèpre, *Mycobacterium leprae*. Le volume d'activité est en diminution par rapport à 2021, due à la panne du LSB3 ayant entraîné un arrêt de l'activité pendant 4 mois (Figure 1). Le nombre d'échantillons reçus pour recherche de *M. leprae* est similaire à celui observé habituellement chaque année, l'année 2021 ayant été une année avec une forte demande (Figure 2).

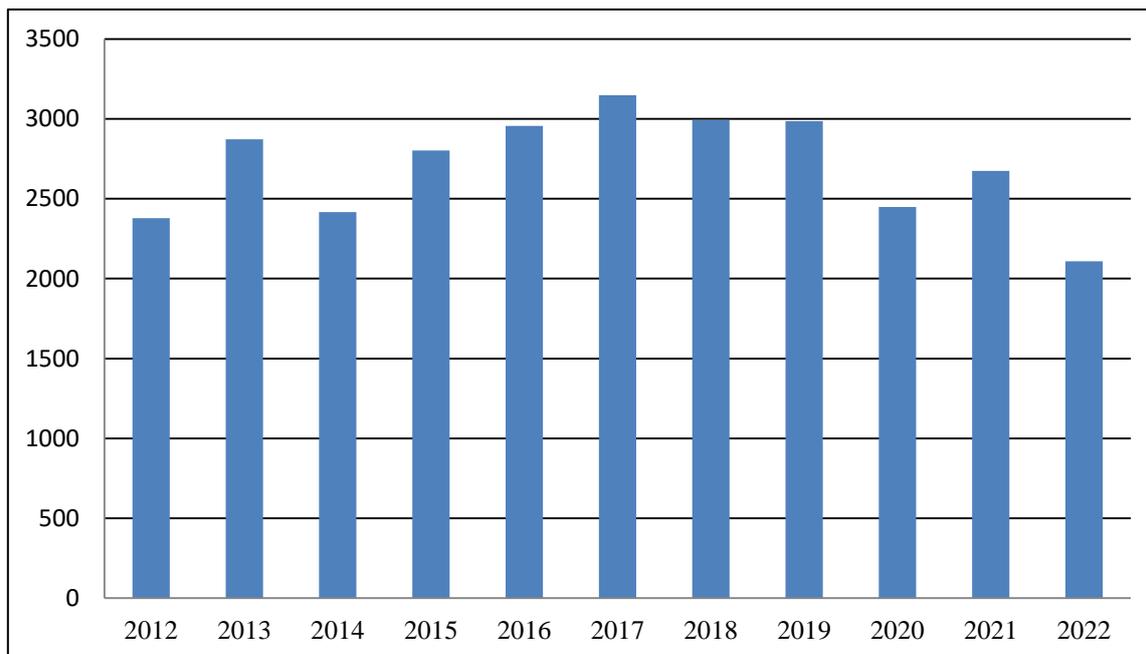


Figure 1. Nombre d'échantillons reçus à l'Institut Pasteur de la Guyane pour la recherche de mycobactéries (hors lèpre).

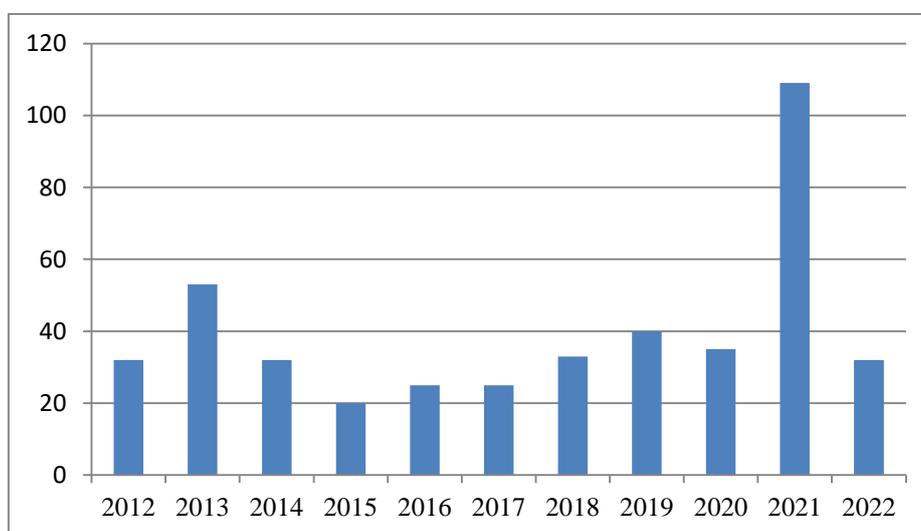


Figure 2. Echantillons reçus à l'Institut Pasteur de la Guyane pour la recherche de M. leprae.

Les demandes proviennent en majorité du Centre Hospitalier de Cayenne (CHC) (78%), qui transfère les demandes du CH et des CPS de la zone Est guyanaise, puis du Centre Hospitalier de l'Ouest Guyanais (CHOG) (15%) et d'Eurofins, qui gère notamment les prélèvements de la Croix Rouge.

Les principaux prescripteurs du CHC sont l'Unité de Maladies Infectieuses et Tropicales (UMIT), la médecine B (pneumologie) et la dermatologie.

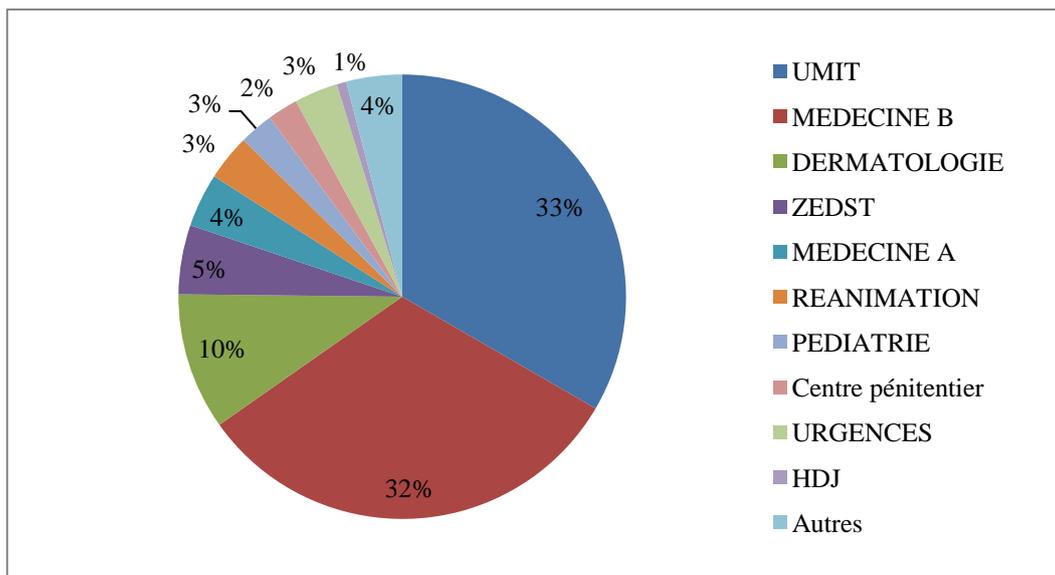


Figure 3. Principaux prescripteurs effectuant le diagnostic de tuberculose et autres mycobactérioses au CHC.

Les échantillons reçus au laboratoire en 2022

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

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

Nature du prélèvement	Echantillons	
	Nombre	(%)
Expectoration	1280	60,9%
Tubage	115	5,47%
Autres Respiratoires	175	8,33%
Urine	196	9,33%
Biopsie	79	3,76%
<i>Dont cutanée</i>	27	1,29%
Ganglion	26	1,24%
Liquide de ponction (ascite, pleural, LCR...)	173	8,23%
Moelle	48	2,28%
Autres prélèvements	8	0,38%
TOTAL	2100	100%

En 2022, 222 cultures étaient positives (10,6%).

Complexe *M. tuberculosis*

Nous avons identifié 34 patients positifs pour la présence du complexe *M. tuberculosis*. Six patients avaient des antécédents de tuberculose à l'Institut Pasteur de la Guyane les années précédentes.

Le sex-ratio est de 2,78 avec 25 hommes (73,5%) pour 9 femmes (26,5%). L'âge médian est de 43 ans (Tableau 2).

Tableau 2 : Données démographiques des nouveaux cas de tuberculose

Année	2018	2019	2020	2021	2022
Age moyen (extrêmes)	43 ans (0*-78)	37 ans (0**-76)	34 ans (21-64)	42 ans (1-88)	43 ans (26-88)
F (%)	22 (35%)	31 (48%)	17 (34%)	32 (46.4%)	9 (26,5%)
M (%)	40 (65%)	33 (52%)	33 (66%)	37 (53.6%)	25 (73,5%)
Total (n=)	62	64	50	69	34

Nous avons réalisé 40 antibiogrammes pour l'année 2022. Un patient présentait une mono-résistance à l'isoniazide (analyse de la mutation en cours par le CNR) (Tableau 3). Un patient présentait une mutation D435Y dans le gène *rpoB* conférant un faible niveau de résistance à la rifampicine chez *M. tuberculosis* non détecté par les méthodes phénotypiques. Ce patient avait déjà été diagnostiqué en 2021.

Six patients ont eu deux antibiogrammes ou plus. 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 > 2 mois.

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

Analyses effectuées	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de prélèvements	3147	2988	2974	2462	2673	2101
Patients positifs pour :						
Mycobactéries atypiques	42	45	38	20	36	22
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MT)	74	62	64	69	69	34
Phénotype de résistance des souches de MT						
Souches multi-résistantes :						
Résistance INH et RIF	0	0	0	0	0	0
Résistance STR et INH	0	1	0	0	0	0
Souches mono résistantes :						
Isoniazide	3	2	0	4	4	1
Rifampicine	0	1	0	0	3	1 (connu)
Streptomycine	1	0	0	0	1	0
Pyrazinamide	0	1	1	0	0	0
Ethambutol	ND	0	0	0	0	0
Proportion de souches avec au moins une résistance	5.4 % (4/74)	8.1% (5/62)	1.6% (1/64)	5.8% (4/69)	11.6% (8/69)	5,9% (2/34)

Mycobactéries atypiques

22 patients étaient positifs à une mycobactérie non tuberculeuse (MNT) (Tableau 4). 16 patients présentaient un seul prélèvement à une MNT. Six patients avaient au moins deux prélèvements positifs à MNT : cinq chez lesquels la même MNT a été isolée et un chez lequel deux MNT différentes ont été isolées. Aucune co-infection à *M. tuberculosis* et une MNT n'a été détectée.

Deux espèces de mycobactéries non tuberculeuses (*M. intracellulare*, *M. fortuitum*) représentent plus de 41,4% (12/29) des isolats. Ces espèces font partie des espèces les plus fréquemment retrouvées chaque année dans notre laboratoire. A noter une diminution des isolements de souches appartenant aux complexes *M. avium* et *M. abscessus* en 2022 par rapport aux années précédentes.

Tableau 4 : Caractéristiques des souches de mycobactéries non tuberculeuses identifiées (Cerba, CNR)

Souches	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre patients	42	31	18	36	22
<i>M. intracellulare</i>	7	8	3	9 (8 patients)	7 (4 patients)
<i>M. lente non chrom.</i>	6	7	0	3 (3 patients)	2 (2 patients)
<i>M. abscessus cplx</i>	7	5	1	8 (5 patients)	1
<i>M. lente chrom.</i>	1	5	0	3 (3 patients)	3 (3 patients)
<i>M. fortuitum</i>	3	4	6	12 (9 patients)	5 (4 patients)
<i>M malmoense/hemophilum</i>	0	3	0	0	0
<i>M. avium</i>	7	2	4	14 (4 patients)	2 (2 patients)
<i>M. kansasii</i>	0	0	0	0	1
<i>M. chelonae</i>	0	0	0	0	2 (1 patient)
<i>M. scrofulaceum</i>	0	2	0	1	2 (2 patients)
<i>M. interjectum</i>	0	1	0	0	1
<i>M. rapide chrom.</i>	0	1	0	0	0
<i>M. gordonnae</i>	4	0	2	1	0
<i>M. szulgai</i>	1	0	1	0	0
<i>M. lentiflavum</i>	1	0	0	1	0
<i>M. marinum</i>	1	0	0	1	2 (1 patient)
<i>M. simiae</i>	1	0	1	0	0
<i>M. genavense</i>	1	0	0	0	0
<i>M. ulcerans</i>	0	0	0	1	0
<i>M. mucogenicum</i>	0	0	1	0	0
<i>M. rapide non chrom.</i>	1	0	0	1	0
<i>M. xenopi</i>	0	0	0	0	1
<i>M. intermedium</i>	0	0	0	1	0
<i>Non identifiées</i>	4	0	0	0	0
Total souches	45	38	19	56	29

Faits marquants en 2022

- L'activité polyvalente du LBM a été arrêtée en mars 2022, avec maintien uniquement de l'activité de diagnostic direct des mycobactéries.
- Le laboratoire devient le Laboratoire de la Tuberculose et des Mycobactéries (LTM)
- Une panne du LSB3 a entraîné un arrêt des activités de culture entre juin et fin octobre 2022.
- L'activité des examens directs a été maintenue entre août et octobre 2022 afin de répondre rapidement au clinicien, de l'orienter dans sa démarche diagnostique et de permettre une prise en charge plus rapide du patient (isolement).
- Une nouvelle biologiste est arrivée en Novembre 2022.

Perspectives en 2023

- Poursuite de l'accréditation du laboratoire des Mycobactéries selon la norme ISO 15189 : examen direct et culture de mycobactéries
- Mise en place de la détection phénotypique d'un haut niveau de résistance à l'isoniazide par antibiogramme en milieu liquide.
- Remplacement d'un automate de culture en milieu liquide Bactec MGIT 320® (Becton Dickinson)
- Développement d'outils de biologie moléculaire :
 - Génotypage pour l'identification d'espèce au sein du complexe *M. tuberculosis* (Hain Lifescience)
 - Génotypage pour l'identification des mycobactéries atypiques (Hain Lifescience)
 - Détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide (Hain Lifescience)
 - Détection de la résistance aux fluoroquinolones
 - PCR *M. ulcerans* et *M. leprae*
- Changement de la société prestataire chargée de la maintenance du laboratoire P3 des mycobactéries.

Rapport rédigé le 16/03/2023 par le Dr Sophie Baron, Pharmacien Biologiste, Responsable du laboratoire de des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Guyane depuis le 02/11/2022.