

La tuberculose chez les enfants de moins de 11 ans : résistance primaire et variants génétiques dominants de *Mycobacterium tuberculosis* à Antananarivo

Rasolofo Razanamparany V¹, Ramarokoto H^{1,3}, Clouzeau J²,
Rasolonavalona T¹, Vololonirina EJ¹, Cauchoix B³, Chanteau S¹

RESUME : Chez l'enfant, la tuberculose est de toute évidence la conséquence d'une primo-infection par *Mycobacterium tuberculosis*. A Madagascar, pays à forte incidence de tuberculose, la plupart des individus s'infectent dans l'enfance.

Des souches BK isolées chez des enfants tuberculeux âgés de moins de 10 ans à Antananarivo ont été étudiées pour : i) évaluer la résistance primaire vraie des BK aux antituberculeux et ii) déterminer les variants génétiques responsables des infections récentes dans la population.

De 1997 à 2000, 2 358 prélèvements d'enfants de 0 à 10 ans, provenant de différents services pédiatriques d'Antananarivo, ont été mis systématiquement en culture : 141 souches (5,9% des prélèvements) ont été isolées de 97 enfants (67 tuberculoses pulmonaires et 30 extra-pulmonaires). A l'exception d'une seule souche résistante à l'isoniazide, toutes les autres souches sont sensibles aux 4 antibiotiques testés (Streptomycine, Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol). Ces résultats confirment le faible taux de résistance primaire observé à Antananarivo lors des deux enquêtes réalisées chez les adultes en 1994-1995, puis en 1999-2000.

Les souches de 69 enfants dépistés en 1997-2000 ont été typées avec le marqueur génétique IS6110. Cinquante-trois souches ont pu être classées en 15 familles de 2 à 9 souches ressemblantes (profils IS6110 identiques ou très proches). Les familles les plus fréquentes correspondent, soit à des souches circulant plus activement pendant la période antérieure de 10 ans, soit à des souches anciennes se maintenant en permanence dans la population. Certaines familles de souches de 1997-2000 avaient déjà été observées en 1994-1995. C'est le cas par exemple des souches à une copie IS6110 retrouvées chez 14,6% des souches d'enfants; ce type de souche pourrait correspondre, comme décrit dans la littérature, à une famille ancestrale. Par contre, 4 familles de souches (21,3% des souches de 1994-1995) semblent ne pas ou peu circuler en 1997-2000.

Le taux de résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques étant faible à Madagascar, on ne peut pas expliquer le maintien ou la disparition de certains variants par une différence dans la sensibilité des souches aux antibiotiques, mais plutôt par une différence dans la virulence des souches.

Mots-clés : Tuberculose - *Mycobacterium tuberculosis* - Enfant - [Antibiotique antituberculeux] - Résistance - Marqueur génétique - Madagascar.

ABSTRACT : "Childhood tuberculosis : primary resistance and genotypes of dominant *Mycobacterium tuberculosis* in Antananarivo" : Tuberculosis during childhood is often due to *Mycobacterium tuberculosis* primo-infection. Tuberculosis is highly prevalent in Madagascar and most people are infected during childhood. Our objectives were to evaluate the primary resistance of *M. tuberculosis* and to determine the genotypes responsible for recent infection in the population. Thus we studied 142 isolated strains from 97 children (66 with pulmonary tuberculosis and 31 with extra-pulmonary tuberculosis) recruited in different health centers in Antananarivo from 1997 to 2000. Excepting one strain resistant to isoniazide, all strains were susceptible to the four antibiotics (streptomycin, isoniazid, rifampicin and ethambutol). This result confirms the low rate of primary resistance reported during the two surveys in 1994-1995 and 1999-2000.

67 strains of 1997-2000 were typed with the genetic marker IS6110, 44 has been assigned to 13 clusters containing each 2 to 8 similar strains. Some IS6110 clusters have already been reported in 1994-1995. Some genotypes observed in 1994-1995 seemed to have disappeared in 1997-2000. (As the rate of the frequency of some genetic variants according to the period are more likely due to a difference in strain virulence). Since there is minimal antibiotic resistance versus *M. tuberculosis* in Madagascar, one can not explain the appearance or disappearance of certain variants because of drug resistance. Rather, this is due to the virulence of the various *M. tuberculosis* strains.

Key-words : Tuberculosis - *Mycobacterium tuberculosis* - Child - [Antitubercular antibiotics] - Resistance - Genetic marker - Madagascar.

¹ Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

² Centre Hospitalier de Soavinandriana, BP 6 bis - 101 Antananarivo - Madagascar.

³ Programme National Tuberculose, Ministère de la Santé, BP 460 - 101 Antananarivo - Madagascar.

INTRODUCTION

Le taux de résistance primaire des souches *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux traduit le taux de souches résistantes qui circulent dans la collectivité. Deux enquêtes réalisées à Madagascar (1994-1995 et 1999-2000) ont révélé un taux de résistance primaire global faible (10 à 20%) et un taux de multirésistance à l'isoniazide et la rifampicine (MDR) faible (0,1-0,25%) [1].

Lors des enquêtes chez les adultes, la résistance primaire, déterminée à partir des patients nouveaux cas c'est à dire n'ayant jamais reçu de traitement anti-tuberculeux, peut-être confondue avec la résistance initiale. Chez les enfants de moins de 10 ans, la tuberculose résulte souvent d'une primo-infection ou tout au moins résulte d'une infection récente. Par conséquent, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches BK isolées chez les enfants doit permettre de déterminer la résistance primaire vraie.

Par ailleurs, une étude du polymorphisme génétique des souches BK circulant en 1994-1995 à Antananarivo (pulmonaire et extra-pulmonaire) a montré l'existence de familles de souches BK (variants génétiques) [2]. A l'heure actuelle, quelles sont les familles de souches BK qui continuent de circuler dans la capitale ? La caractérisation génétique des souches BK isolées chez les enfants doit permettre de répondre à cette question.

L'objet de cette étude était donc de caractériser les souches *M. tuberculosis* isolées d'enfants tuberculeux de 0 à 10 ans de 1997 à 2000, dans le but de déterminer la résistance primaire vraie aux antituberculeux et d'étudier les variants génétiques de *M. tuberculosis* circulant actuellement dans la capitale.

METHODOLOGIE

De 1997 à 2000, tous les prélèvements reçus au laboratoire des mycobactéries de l'IPM, provenant d'enfants de 0 à 10 ans suspects de tuberculose (de 12 centres de diagnostic d'Antananarivo), ont été examinés par microscopie après coloration à l'auramine et mis en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen. Les souches identifiées comme *M. tuberculosis* ont été testées pour leur sensibilité aux 4 antibiotiques majeurs du traitement antituberculeux: streptomycine (S), isoniazide (H), rifampicine (R) et éthambutol (E).

Les profils génétiques des souches BK ont été déterminés par la technique standardisée de "Restriction Fragment Length Polymorphism"

avec le marqueur IS6110 (RFLP/IS6110) [3]. Les profils génétiques des souches isolées en 1997-2000 ont été ensuite comparés avec ceux des souches de 1994-1995.

RESULTATS

Culture

De 1997 à 2000, 2 372 prélèvements biologiques (1 827 d'origine pulmonaire, 545 extrapulmonaire) provenant de 812 enfants \leq 10 ans ont été mis en culture au laboratoire des mycobactéries (tableaux I et II). Sur 142 prélèvements positifs à la culture, 137 étaient des *M. tuberculosis* et 5 *M. bovis*. Sur les 812 enfants suspects de tuberculose, 97 (66 tuberculeux pulmonaires, 31 extrapulmonaires) avaient au moins un prélèvement à culture positive.

Tableau I : Résultats de la culture de BK selon la nature des prélèvements chez les enfants

Prélèvements	Nombre	Nombre de culture BK	positive (%)
Expectoration (crachat, LAB, TG)	1827	111 (5 <i>M. bovis</i>)	(6,1)
LCR	400	11	(2,8)
Pleurale	33	4	(12)
Ganglionnaire	26	9	(34,6)
Urine	16	0	
Pus	44	6	(13,6)
Ascite	13	0	
Biopsie plaie	1	1	(100)
Synovial	3	0	
Autres extrapulmonaires	9	0	
Total	2372	142	(6)

Sensibilité aux antibiotiques

Sur 97 souches BK isolées chez les enfants, 96 sont sensibles aux 4 antibiotiques testés (S, H, R et E) et une seule souche (d'une tuberculose ganglionnaire) est résistante à l'isoniazide (tableau II).

Tableau II : Résultat de la culture de BK et de l'antibiogramme chez les enfants \leq 10 ans (1997-2000)

Tuberculose	Nombre	Positifs (%)	ATB*
Pulmonaire	812	66 (8,1)	sensibles
Extra-pulmonaire	539	31 (5,7)	
Ganglionnaire	26	9	1H ^R
Pleurale	13	4	sensibles
Méningite	399	11	sensibles
Pus	43	6	sensibles
Plaie	1	1	sensible
Total	1351	97 (7,1)	

* ATB : antibiotique * H^R: résistant à l'isoniazide

Profils génétiques IS6110 des souches *M. tuberculosis* isolées d'enfants en 1997-2000

Les profils génétiques de 67 souches BK ont été déterminés avec le marqueur IS6110. Treize familles de souches ont été mises en évidence chez les enfants

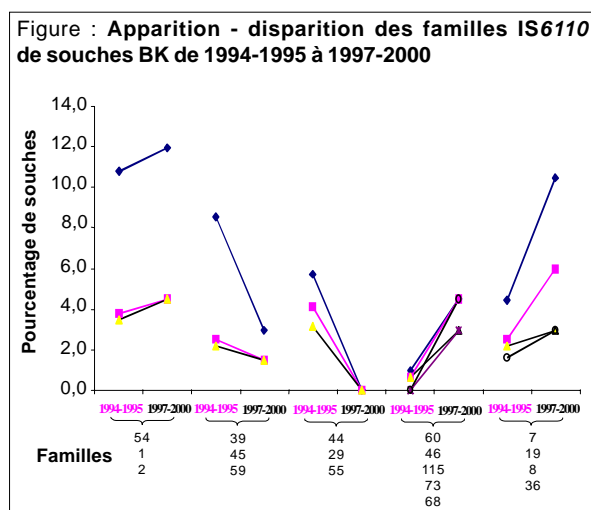
tuberculeux de 1997 à 2000 (tableau III). La famille la plus fréquente (11,9%) est le profil IS6110 N° 54 avec une bande unique à 1,5kb.

Nous avons comparé la fréquence des familles IS6110 observées chez les enfants en 1997-2000 avec celle des familles qui avaient été trouvées en 1994-1995. Certaines familles de souches (N°1, 2, 54) continuent à se maintenir dans la collectivité à la même fréquence. D'autres familles de souches assez fréquentes en 1994-1995 semblent ne plus ou peu circuler en 1997-2000 (N°39, 45, 59, 44, 29, 55). Enfin, des familles peu ou pas observées en 1994-1995 ont été retrouvées à des fréquences beaucoup plus élevées en 1997-2000 (Figure).

Tableau III : Répartition en 13 familles IS6110 des souches *M. tuberculosis* isolées chez les enfants de 1997-2000

Famille N° *	54	7	19	1	2	46	60	73	8	36	39	68	115
N° souches BK	8	7	4	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2

* Les N° de familles correspondent à une numérotation arbitraire adoptée au laboratoire



DISCUSSION

La première observation que l'on peut faire est le faible taux de culture positive chez les enfants, 6% des prélèvements sont positifs et seulement 7,1% des enfants suspects de tuberculose ont eu un prélèvement culture positive. Ceci pourra avoir une influence sur les résultats de cette étude car vraisemblablement, nous ne sommes pas en possession de toutes les souches circulant pendant la période de l'étude. Cependant, ces chiffres se

rapprochent de ceux rapportés généralement chez les enfants.

Dans cette étude, une seule souche sur les 97 testées est résistante à l'isoniazide et aucune souche multirésistante n'a été trouvée. Ce qui confirme le faible taux de MRD observé lors des enquêtes chez les adultes [1]. L'étude des souches d'enfant doit donc permettre de surveiller la résistance primaire aux antituberculeux.

Concernant la variabilité génétique des souches BK avec le marqueur IS6110, certains variants génétiques se maintiennent dans la population de BK circulant à Antananarivo entre 1994 et 2000. D'autres semblent avoir disparu en 1997-2000, tandis que de nouvelles familles sont apparues. Les familles de souches les plus fréquentes correspondent soit à des souches circulant activement pendant la période antérieure de 10 ans, soit à des souches anciennes se maintenant en permanence dans la population. Il apparaît donc que la population de BK ne soit pas stable mais varie au cours du temps. Cette variabilité n'est pas liée à la résistance des souches aux antibiotiques. Elle pourrait être expliquée par une différence dans la virulence des souches.

REMERCIEMENTS

Programme National Tuberculose - CENHOSOA (Pavillon Roques, Service de Pédiatrie) - IHS (DAT, laboratoire des mycobactéries - Hôpital des Enfants Tsaralalana - Hôpital général de Befelatanana (SMR, Pédiatrie) - Hôpital des Enfants Ambohimandra (Pédiatrie) - CHU Fenoarivo - CHU HJRA - ECAR Anatihazo - Hôpital Luthérien d'Ambohibao - IPM (CBC, laboratoire des mycobactéries).

REFERENCES

- 1- Chanteau S, Rasolofo V, Ramarakoto H, Rasolonalona T, Ratsirahonana O, Ratsitorahina M, Rakotomanana F, Boisier P, Cauchoix B, Aurégan G. Anti-tuberculosis drug resistance in Madagascar in 1994-1995. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1 : 405-410.
- 2- Rasolofo-Razanamparany V, Ménard D, Aurégan G, Gicquel B, Chanteau S. Extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis in Antananarivo (Madagascar) : high clustering rate in female patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40 : 3964-3969.
- 3- Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans PWM, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31 : 406-409.