



ARTICLE ORIGINAL

La répartition de mycobactérium tuberculosis du génotype Beijing et sa relation avec la résistance des médicaments antituberculeux au Viet Nam

Beijing genotype distribution and its association with drug resistance of mycobacterium tuberculosis in Viet Nam

N.V. Hung¹, K.T.T. Ngoc¹, D.N. Sy¹, N.T.N. Lan², E.W. Tiemersma³, F.G.J. Cobelens³, D. van Soolingen⁴

¹: Hôpital National de Pneumo-Phtisiologie

²: Hôpital Pham Ngoc Thach ; ³: Fondation Anti-Tuberculose du Pays-Bas (KNCV)

⁴: Institut National de Santé Publique et de l'Environnement du Pays-Bas (RIVM)

SUMMARY

Introduction. In Viet Nam, overall drug resistance rate was 30.9%, multi-drug resistance was 2.7%. The aims of the study is to learn about Beijing genotype distribution and association with resistant of *M. tuberculosis* tuberculosis in different regions in Vietnam.

Materials and methods. Mycobacterial culture had been done by modify Petrop method and all DST was done by Canetti - Grosset proportions method. Genotyping was done at the National Reference Laboratory - National Lung Hospital by Spoligotyping.

Results. The proportion of Beijing genotype on national is 30.1% in the North, 28.6% in the Central, and 39% in the South. Among new pulmonary tuberculosis patients, Beijing genotype with any-drug resistant tuberculosis was 43.4% and MDR-TB was 5%. In the previous treatment pulmonary tuberculosis patients group, Beijing genotype with any-drug resistant tuberculosis was 74% and MDR-TB was 26%.

Conclusion. There are differences about Beijing genotype distribution in the country. Beijing genotype is associated with drug resistance.

KEYWORDS: *M. tuberculosis* Beijing genotype, MDR-TB, spoligotyping

RESUME

Introduction. Les formes multi-résistantes et ultra-résistantes représentent 30,9% et 2,7% des cas au Viet Nam. L'objectif de cette étude est d'étudier la répartition géographique de *M. tuberculosis* de génotype Beijing au Vietnam et de rechercher une relation entre ce génotype et une résistance aux antituberculeux.

Matériel et méthodes. La culture des mycobactéries est réalisée selon la méthode modifiée de Petrop. L'antibiogramme est obtenu selon la méthode de proportion indirecte de Canetti - Grosset. La détermination de *M. tuberculosis* de génotype Beijing est faite selon la technique de spoligotyping.

Résultats. Le taux de souches de *M. tuberculosis* de génotype Beijing est de 30,1% au Nord, de 28,6% au centre et de 39% au Sud. Parmi les patients présentant une tuberculose de novo, le taux de souches de génotype Beijing résistantes à n'importe quelle sorte d'antituberculeux est de 43,4% (tuberculose de novo) et le taux de multirésistantes est de 5%. Le taux passe à 74% pour les souches résistantes à n'importe quel antituberculeux chez les patients déjà traités et à 26% pour la forme multirésistante.

MOTS CLES: *M. tuberculosis* de génotype Beijing, MT-RMD, spoligotyping

Auteur correspondant: Ngoc KHIEU THI THUY. Hôpital National de Pneumo-Phtisiologie. Ha Noi-VietNam
E-mail: ngoc_kt@yahoo.com

INTRODUCTION

D'après la deuxième enquête mondiale réalisée entre 1991 et 2001 dans 75 pays différents de tous les continents, le taux de tuberculose résistante est en moyenne de 1,1%. Le taux le plus élevé (14,2%) est enregistré au Kazakhstan et en Israël. Les «points chauds» de *M. tuberculosis* multirésistants (> 5%) dans le monde ont été signalés dans: la Russie, l'Ouzbékistan, l'Estonie, la Chine, la Lituanie, la Lettonie et l'Écuador. Dans le groupe des patients recevant un traitement antituberculeux, le taux moyen de résistance aux médicaments a été de 18,4% et de résistance à plusieurs médicaments a été de 7,0% [1]. Selon l'OMS, le Viet Nam est le douzième pays sur les 22 les plus touchés par la tuberculose. La tuberculose est la cinquième cause de décès au Vietnam avec un taux de 173/100 000 habitants. Particulièrement grave est l'apparition et la propagation de souches résistantes à l'isoniazide (INH) et à la rifampicine (RIF). La troisième enquête nationale réalisée en 2005 a mis en évidence un taux global de résistance de 30,9%, et de multirésistance de 2,7%.

Chez les patients déjà traités, le taux global de résistance est de 58,9% et le taux de multirésistance est de 19,3%. Dans le groupe de patients atteints de tuberculose de novo, le taux global de souches résistantes est de 34%, et celui de souches multirésistantes est de 4,6% [2]. Des études antérieures réalisées au Vietnam ont montré que des souches de *M. tuberculosis* de génotype Beijing se répandaient et qu'il existait une forte association entre ce génotype et la multirésistance [3].

Cependant, ces études ne peuvent être représentatives de l'ensemble de la situation au Vietnam. Comment les génotypes de *Mycobacterium tuberculosis* se transmettent, se répartissent et deviennent multi ou ultra-résistants est une question fondamentale à laquelle le programme de lutte contre la tuberculose au Vietnam se doit de répondre.

L'objectif de l'étude est d'étudier la répartition de *M. tuberculosis* du génotype Beijing et la relation avec la résistance aux médicaments antituberculeux au Viet Nam.

MATERIEL ET METHODES

Les 1 802 souches de *M. tuberculosis* récoltées pendant la troisième enquête nationale sur l'étude de la résistance aux antituberculeux réalisée en 2005 ont été revues. Ces souches ont été conservées et stockées à -72°C au département de microbiologie de l'Hôpital National de Pneumo-Phthisiologie. Le recueil des données sur les antécédents des patients a été établi à partir des fiches d'enquête collectées entre juillet et septembre 2007. Cela a concerné 1 575 patients répartis en deux groupes: ceux qui

présentaient une tuberculose pulmonaire de novo (n = 1 390) et ceux déjà traités (n = 185).

La culture des bacilles tuberculeux est faite sur milieu de Lowenstein-Jensen selon la méthode modifiée de Petrop. La lecture des résultats est faite à 2, 4, 6 et 8 semaines. L'antibiogramme pour les antituberculeux de première ligne a été établi selon la méthode à proportion indirecte de Canetti-Grosset: isoniazide (H): 0,2 µg/ml, rifampicine (R): 40 µg/ml, streptomycine (S): 4 µg/ml, ethambutol (E): 2 µg/ml.

La détermination de *M. tuberculosis* de génotype Beijing est faite par spoligotypage. Cette méthode est basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour identifier la séquence courte directement répétitive (DR) intercalée entre les fragments tamponnés (spacer) non répétitifs. Le génotype Beijing est défini comme la souche ne présentant pas de fragments tamponnés de 1 à 34, et présentant des fragments tamponnés de 35 à 43 [4].

Nous avons suivi les étapes techniques de spoligotypage selon les processus standardisés de l'Institut National de Santé Publique et de l'Environnement des Pays-Bas [5]. Les données sur la perte ou la présence de l'ordre des fragments tamponnés ont été comparées avec les données internationales de spoligotypage comme SpolDB4 [6].

Analyse des données

Les données collectées lors de l'enquête ont été consignées sur des fiches. L'intégration des renseignements et l'analyse des résultats ont été faites avec le logiciel EpiData (version 3.1).

RÉSULTATS

Caractéristiques des patients

Caractéristiques démographiques

Les hommes représentent 73% des patients et les femmes 27%. Le ratio homme/femme est de 2,7.

80 centres de recherche ont participé à l'enquête: 27 au Nord, 12 au centre et 41 au Sud.

Parmi les souches de *M. tuberculosis* étudiées, 31,7% provenaient du Nord, 10,5% du Centre et 57,8% du Sud (Tableau 1).

TABLEAU 1. Répartition de *M. tuberculosis* selon le sexe et l'origine

Caractéristiques	Nombre de patients	Pourcentage (%)
<i>Sexe</i>		
Homme	1 316	73,0
Femme	486	27,0
<i>Région géographique</i>		
Nord	572	31,7
Centre	189	10,5
Sud	1 041	57,8
Total	1 802	100

Le génotype Beijing représente 35,1% des souches de *M. tuberculosis* présentes au Viet Nam. La répartition géographique de ce génotype est différente entre les trois régions: allant de 39% au Sud, à 30,1 % au Centre et 28,6% au Nord (Tableau 2). Cette différence observée est probablement vraie ($p < 0,01$).

Répartition des souches de *M. tuberculosis* par génotype et par résistance

Le Tableau 3 montre que le pourcentage de souches du génotype Beijing résistant à n'importe quelle sorte d'antituberculeux est de 43,4%, et que le pourcentage de souches du génotype Beijing multirésistant est de 5,0%. De façon corrélative, pour une souche de génotype Beijing, le risque d'être résistante à n'importe quel antituberculeux est de: OR = 2,3 (1,8 - 3,0) (pour la résistance à n'importe quelle sorte) et OR = 3,6 (1,5 - 8,4) (pour la multirésistance).

Ratio/OR: 1,8 - 3,0 ; intervalle de confiance/IC 95% ; $p < 0,01$) et le risque pour une souche de génotype Beijing d'être multirésistante est de 3 (1,6 - 5,8 ; IC 95% ; $p < 0,01$).

Selon le Tableau 4, le taux de souche de génotype Beijing présentant une résistance à n'importe quelle sorte d'antituberculeux est de 74%, et de 26% pour une multirésistance.

Dans le sous-groupe de patients déjà traités, le risque pour le génotype Beijing de présenter une résistance à n'importe quelle sorte d'antituberculeux ou une multirésistance est plus élevée que pour les autres génotypes (OR = 4,0: 2,1 - 7,4 ; IC 95% ; $p < 0,01$ pour la résistance à n'importe quelle sorte et OR = 3,6: 1,5 - 8,4 ; IC 95% ; $p < 0,05$, pour la multirésistance).

TABLEAU 2. Répartition de *M.tuberculosis* de génotype Beijing selon l'origine géographique

Région	Nord		Centre		Sud		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Beijing	172	30,1	54	28,6	406	39,0	632	35,1
Non Beijing	400	69,9	135	71,4	635	61,0	1170	64,9
($p < 0,01$)								

TABLEAU 3. Répartition des souches de *M.tuberculosis* selon le génotype et la résistance chez les patients atteints de tuberculose de novo

Résistance	N'importe quelle sorte (1)		Multi-drogues (2)		Total	OR (1) IC 95%	OR (2) IC 95%
	n	%	n	%			
Beijing	199	43,4	23	5,0	458	2,3 (1,8 - 3,0)	3,0 (1,6 - 5,8)
Non Beijing	230	24,7	16	1,7	932	1	1

TABLEAU 4. Répartitions des souches de *M. tuberculosis* selon le génotype et selon l'existence ou non d'un traitement antituberculeux antérieur

Résistance	N'importe quelle sorte (1)		Multi-drogues (2)		Total	OR (1) IC 95%	OR (2) IC 95%
	n	%	n	%			
Beijing	71	74,0	25	26,0	96	4,0 (2,1 - 7,4)	3,6 (1,5 - 8,4)
Non Beijing	37	41,6	8	9,0	89	1	1

DISCUSSION

D'après l'OMS, 2/3 des tuberculoses maladies surviennent chez des hommes. Les données déclarées de programme national de lutte contre la tuberculose (2001) ont montré que les patients masculins atteints de tuberculose représentent 65% des formes tuberculeuses obtenues annuellement dans le pays entier. Au Vietnam, les chiffres obtenus par le programme national de lutte contre la tuberculose datant de 2001 sont superposables (65%). Dans notre étude, les hommes représentent 73% des sujets malades. Le ratio homme/femme est de 2,7, ce qui est comparable aux données de l'OMS et du programme national de lutte contre la tuberculose. La proportion de souches de génotype Beijing est de 35,1% au Vietnam avec une répartition géographique variable, allant de 39% au Sud, 30,1% au Nord et 28,6% au Centre.

Dans l'étude présentée par Dang D.A en 2001 [3], la proportion de génotype Beijing est de 53%. Ce taux est nettement supérieur à celui retrouvé dans notre étude. Cette différence peut s'expliquer par la différence de recrutement entre les deux études. En effet, dans l'étude de Dang DA et col., seules ont été étudiées les souches des patients tuberculeux hospitalisés à l'Hôpital National de Pneumophtisiologie et à l'hôpital Pham Ngoc Thach. Les résultats de cette étude ne reflètent pas la répartition du génotype Beijing dans l'ensemble du pays.

A Taïwan, Jou R et al. [7] ont trouvé en 2003 une proportion de souches de génotype Beijing de 44,4%. Ce génotype est donc très fréquent dans les pays asiatiques. Pour les patients présentant une tuberculose de novo, le fait d'être infecté par une souche de génotype Beijing par rapport à un autre génotype augmente le risque d'être infecté par une souche résistante, que ce soit à n'importe quel antituberculeux (OR = 2,3, intervalle de confiance 95%, CI 1,8 - 3,0 ; $p < 0,01$) ou multirésistante (OR 3,0, intervalle de confiance 95%, CI 1,6 - 5,8 ; $p < 0,01$).

Kremer et al. [8] ont publié en 2009 une étude comparative des souches de M. tuberculosis de génotype Beijing en provenance du Viet Nam et des Pays-Bas. La proportion de souches multirésistantes d'origine vietnamienne était significativement plus élevée que celles d'origine néerlandaise (6,7% vs 2,0%). Pour la résistance à l'isoniazide (INH), la proportion était de 32,1% et 11% respectivement ($p < 0,01$). Pour la résistance à la streptomycine (SM), la proportion était de 44,0% et de 15,9% respectivement ($p < 0,01$). Dans l'étude taïwanaise, la proportion de souches résistantes à n'importe quel antituberculeux était de 46,4%. Ceci reflète l'augmentation de la fréquence des souches résistantes dans les pays asiatiques.

Dans le groupe des patients déjà traités, les souches de génotype Beijing sont plus souvent résistantes que les autres génotypes, que ce soit à n'importe

quel antituberculeux ou multirésistante, 74% (OR 4,0, intervalle de confiance, CI 2,1-7,4 ; $p < 0,01$) et 26% (OR 3,6, niveau de confiance 95%, CI, 5-8,4 ; $p < 0,05$).

L'enquête de Buu et al. publiée en 2010 [9] montre des résultats similaires : la multirésistance est étroitement associée au génotype Beijing. Dans le groupe de patients atteints de tuberculose pour la première fois ($n = 1\ 010$), la proportion de souches multirésistantes est de 5,3% (17/231) lorsqu'il s'agit d'un génotype Beijing et de seulement 0,7% (5/689) pour les autres génotypes (OR 7,5 ; $p < 0,01$). Chez les patients déjà traités ($n = 96$), le pourcentage de souches de génotype Beijing multirésistantes était de 28,8% (17/59), alors que celui des autres souches étaient de 8,1% (3/37) (OR 3,6 ; $p = 0,019$).

Pour l'année 2008, selon l'OMS, 3,6% des tuberculoses mondiales sont causées par des souches de M. tuberculosis multirésistantes. Le taux de tuberculose multirésistante varie de 0 à 28% pour les patients atteints de tuberculose de novo, et de 0 à 61,6% pour les patients déjà traités [10]. Les souches de M. tuberculosis de génotype Beijing ont la caractéristique d'avoir des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN très efficaces. Ceci leur donne un avantage dans la sélection naturelle [11]. En comparaison avec d'autres souches, les souches résistantes de génotype Beijing causent des formes plus graves de tuberculose et diminuent les défenses immunitaires de l'hôte infecté. Ceci favorise les échecs thérapeutiques et les récurrences [4, 12].

Au cours des dernières décennies, les souches de M. tuberculosis de génotype Beijing sont pour une grande part responsables de la propagation des formes résistantes de tuberculose au plan mondial, et plus particulièrement dans les pays asiatiques où la prévalence de cette souche est très élevée.

CONCLUSION

L'étude des 1 802 souches de bacilles tuberculeux isolées à partir de prélèvements biologiques chez des patients en 2005 pendant la troisième enquête nationale sur l'étude de la résistance aux antituberculeux a montré que la M. tuberculosis de génotype Beijing se répartit de façon différente dans le pays. Globalement, on le retrouve dans 35,1% des isolats, avec une fréquence de 30,1% au Nord, 28,6% au Centre et 39% au Sud ($p < 0,01$). M. tuberculosis de génotype Beijing est étroitement lié à la résistance aux antituberculeux, en particulier à la multirésistance, quel que soit le groupe de patients étudiés (patient atteint de tuberculose pour la première fois, ou patient déjà traité). Cela peut être une explication à l'augmentation du nombre de cas de tuberculose multirésistante au Viet Nam.

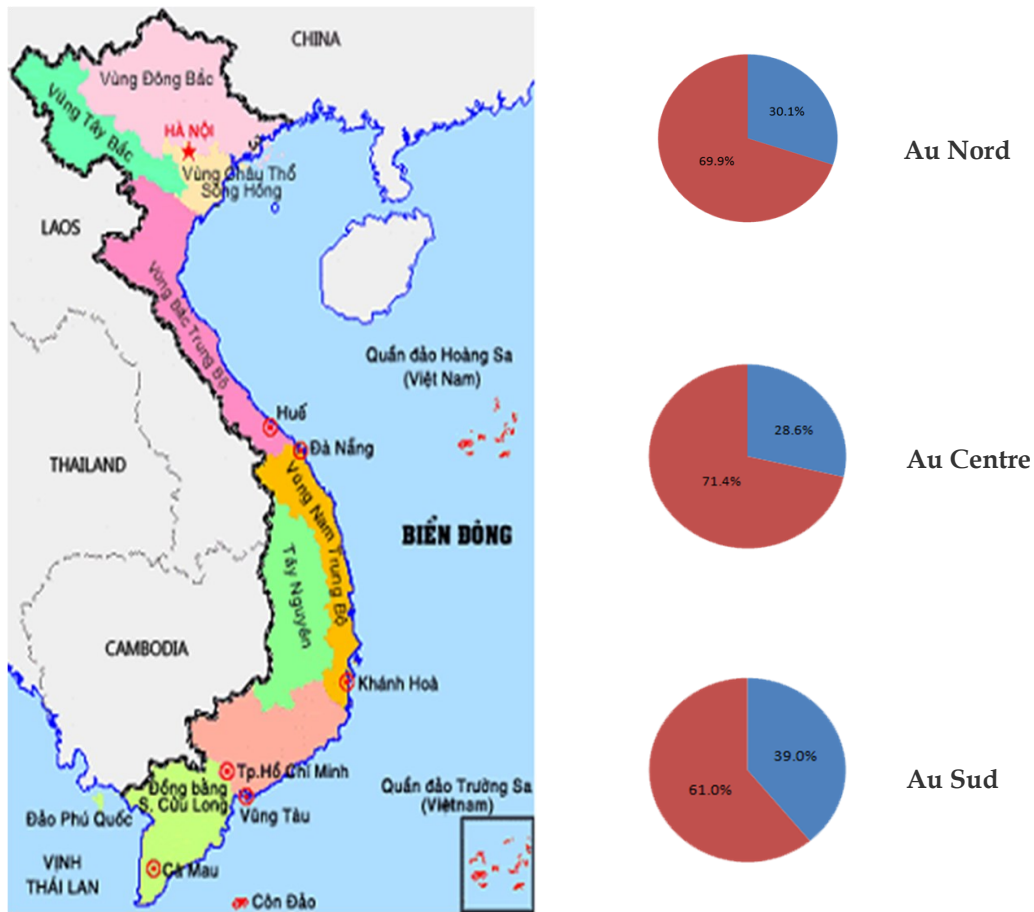


FIGURE 1. Répartition de *M. tuberculosis* de génotype Beijing selon l'origine géographique. (Histogramme: couleur rouge: phénotype non Beijing; couleur bleu: phénotype Beijing)

CONFLIT D'INTERETS

Aucun.

REFERENCES

- van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3 234-8.
- Nguyen Binh Hoa, Dinh Ngoc Sy, Nguyen Viet Nhung, Edine W Tiemersma, Martien W Borgdorff, et al. National survey of tuberculosis prevalence in Viet Nam. *Bulletin of the World Health Organization* 2010; 88.
- Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NTN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Bắc kinh genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 302-5.
- Nguyen Thi Ngoc Lan, Hoang Thi Kim Lien, Le B. Tung, Martien W. Borgdorff, Kristin Kremer, and Dick van Soolingen. *Mycobacterium tuberculosis* Bắc kinh Genotype and Risk for Treatment Failure and Relapse, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*. www.cdc.gov/eid. Vol. 9, No. 12, December 2003.
- Kristin Kremer, Annelies Bunschoten, Leo Schouls, et al. International standard protocol for Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in RIVM, the Netherland 2009.
- Brudey K., et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006.
- Jou R, Chiang CY, Huang WL. Distribution of the Bắc kinh family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Clin Microbiol*, 43(1): 95-100.
- Kristin Kremer, Dang D. Anh, Kai M. Kam, H. Rogier van Doorn, Martien W. Borgdorff, and Dick van Soolingen. Vaccine-induced Immunity Circumvented by Typical *Mycobacterium tuberculosis* Bắc kinh Strains. *Emerg Infect Dis* 2009; Volume 15, No 2.
- Tran N. Buu, Mai N. T. Huyen, Dick van Soolingen, Nguyen T. N. Lan, Hoang T. Quy, Edine W. Tiemersma. Tuberculosis Treatment Failure in Vietnam. *The Infectious Diseases Society of America*. 9/2010.
- Buu TN, Huyen MN, Lan NT, Quy HT, Hen NV, Zignol M, Borgdorff MW, Cobelens FG, van Soolingen D. The Bắc kinh genotype is associated with young age and multidrug-resistant tuberculosis in rural Vietnam. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 51(8).
- Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 30-7.
- Kristin Kremer, Annelies Bunschoten, Leo Schouls, Dick van Soolingen, and Jan van Embden., International standard protocol for Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in RIVM, the Netherland 2009.