



MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES DANS LES ECHANTILLONS DES PATIENTS TUBERCULEUX ADMIS POUR RETRAITEMENT EN 2014 AU BENIN : PREVALENCE ET FACTEURS ASSOCIES

Wachinou A P^{1,2}, Agodokpessi G^{1,2}, Affolabi D^{1,2,3}, Dedewanou H³, Yehouenou C³, Esse M¹, Agbangla C,⁴ Anagonou S^{1,2},

¹ Centre National Hospitalier Universitaire de Pneumo-Phtisiologie, Cotonou

² Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin

³ Laboratoire de Références des Mycobactéries, Cotonou, Bénin

⁴ Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Bénin

Auteur correspondant : WACHINOUE Ablo Prudence, Médecin Pneumologue, Assistant à la Faculté des Sciences de la Santé ; 01 BP 188 Cotonou Tel : +229 67173068 ; Email : wachinouprudence@yahoo.fr

RESUME

Introduction. Il n'existe pas de données sur la prévalence des Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT) au Bénin. L'objectif de ce travail était de déterminer la prévalence des MNT dans les échantillons des patients admis en traitement au Bénin et d'identifier les facteurs associés. **Patients et Méthode.** Il s'agissait d'une étude transversale qui a porté sur les échantillons des patients admis en traitement dans tous les Centres de Dépistage et de Traitement (CDT) de la tuberculose (TB) du Bénin en 2014. Un examen GeneXpert et une culture sur milieu de Lowenstein ont été réalisés sur les échantillons de crachat envoyés au Laboratoire de Références des Mycobactéries (LRM). La souche de mycobactéries a été identifiée grâce au **MTB Complex Hain CM/AS assay** sur les cultures positives. **Résultats.** Sur les 226 patients admis en traitement en 2014 au Bénin, 214 échantillons ont été reçus au LRM. La culture était positive, négative et contaminée dans respectivement 58%, 40% et 2% des échantillons. Les MNT étaient retrouvées dans 10 échantillons soit une prévalence de 8,1% (10/123). Le complexe MAC (*M. avium* et *M. intracellulare*) était le plus fréquent (4/10). Les MNT étaient majoritairement diagnostiqués dans les échantillons des patients admis pour rechute (7/10). **Conclusion.** Cette étude a permis de démontrer la présence des MNT dans les échantillons des patients admis pour traitement au Bénin. Ce résultat devrait être pris en compte dans les stratégies de prise en charge des cas de traitement.

Mots clés : prévalence, mycobactéries non tuberculeuses, traitement, Bénin

ABSTRACT

Introduction. There are no data on the prevalence of Non Tuberculous Mycobacteria (NTM) in Benin. The objective of this study was to determine the prevalence and associated factors of NTM in samples of patients diagnosed with retreatment tuberculosis (TB) in Benin. **Patients and Method.** This was a cross-sectional study carried out on the samples of retreatment TB cases registered in all the Basic Management Units (BMU) of Benin in 2014. A GeneXpert test and a culture on Lowenstein media were performed on all the samples received at the Reference Laboratory of Mycobacteria (RLM) in Cotonou. MTB Hain Complex CM / AS was used on the positive cultures to identify the Mycobacteria strains. **Results.** Of the 226 patients retreatment cases diagnosed in 2014 in Benin, 214 samples were received at the RLM. The culture was positive, negative and contaminated in respectively 58%, 40% and 2% of the samples. NTM were found in 10 samples, with a prevalence of 8.1% (10/123). The MAC complex (*M. avium* and *M. intracellulare*) was the most common (4/10) species isolated. NTM were predominantly diagnosed in samples of patients with relapse (7/10). **Conclusion.** This study demonstrated the presence of NTM in the samples of patients diagnosed with retreatment TB cases. This result should be taken into account in the management strategies of the retreatment cases in Benin.

Key words: prevalence, non-tuberculous mycobacteria, reprocessing, Benin

INTRODUCTION

Les Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT) sont des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) autres que ceux du complexe tuberculose et *Mycobacterium leprae* [1].

Elles sont habituellement localisées dans l'environnement, les canalisations d'eau et sur diverses surfaces. Plus de 125 espèces ont déjà été décrites dont certaines ne sont pas pathogènes et d'autres très rarement isolées

[2]. Comme le complexe tuberculose, les MNT peuvent atteindre tous les organes mais avec une préférence pour les voies respiratoires [3]. Lorsqu'elles atteignent les poumons, elles peuvent être responsables soit d'une simple colonisation, soit d'une infection pulmonaire avérée à MNT (IPMNT). Les facteurs qui favorisent la survenue des infections pulmonaires à MNT sont l'immunodépression profonde notamment celle de l'infection à virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les patho-

logies respiratoires chroniques, les séquelles de maladies pulmonaires notamment chez les anciens malades tuberculeux [4].

Contrairement aux pays développés, l'épidémiologie des IPMNT a été très peu étudiée dans les pays à faible revenu où les moyens diagnostiques sont limités. De plus dans ces pays, le traitement de la tuberculose est d'abord présomptif car la microscopie qui est l'outil de diagnostic le plus largement utilisé ne permet pas de distinguer entre *Mycobacterium tuberculosis* et une MNT.

A notre connaissance, il n'existe pas de données disponibles au Bénin sur la prévalence des MNT dans les échantillons respiratoires. L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence des MNT et les facteurs associés dans les échantillons des patients admis pour retraitement au Bénin en 2014.

PATIENTS ET METHODE

Type d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale à visée descriptive et analytique qui a eu lieu de Février à Août 2016 au Laboratoire de Référence des Mycobactéries (LRM) du Programme National contre la Tuberculose (PNT) du Bénin.

Organisation du PNT

Le PNT s'appuie sur un réseau de 68 Centres de Dépistage et Traitement (CDT) répartis sur toute l'étendue du territoire. Chaque CDT dispose d'un laboratoire de microscopie qui réalise l'examen direct des crachats à la recherche de BAAR soit par la coloration de Ziehl-Nielsen (microscope optique) soit par la coloration à l'auramine (microscope à fluorescence).

Chez tout cas présumé de tuberculose, deux échantillons de crachats sont recueillis en 24 heures dont un crachat matinal. Lorsque la recherche des BAAR est positive dans au moins un des échantillons, le patient est déclaré cas de tuberculose bactériologiquement confirmé. Il est alors catégorisé soit comme un nouveau cas, soit un cas de retraitement. Les nouveaux cas sont les patients qui n'ont jamais reçu auparavant de traitement antituberculeux ou qui en ont reçu pendant moins d'un mois. Les cas de retraitement sont ceux qui ont déjà reçu par le passé un traitement antituberculeux qui a duré au moins un mois. Les définitions des sous-types de retraitement (rechute, échec, reprise après abandon) sont consignés dans l'encadré 1.

Dans le cadre de la surveillance continue de la résistance aux antituberculeux, lorsqu'un diagnostic de retraitement est posé, deux échantillons sont prélevés et systématiquement envoyés vers le LRM à travers un système de transport publique. Les échantillons sont transportés dans des boîtes de conditionnement qui garantissent leur bonne conservation et la biosécurité.

Encadré 1. Définition des cas de retraitement [5]

- **Cas de rechute** : malade traité antérieurement pour une tuberculose qui a été déclaré « guéri » ou « traitement terminé » et est aujourd'hui diagnostiqué comme présentant un épisode récurrent de tuberculose bactériologiquement confirmée.
- **Cas d'échec** : patient sous traitement dont les frottis de contrôle sont positifs à la fin du 5ème ou du 6ème mois.
- **Cas de reprise après abandon** : malade qui a pris un traitement antituberculeux pendant au moins un mois, qui a interrompu son traitement pendant au moins 2 mois consécutifs et qui revient avec des symptômes et un examen bactériologique positif.

Echantillons et manipulations au LRM

Etaient inclus dans cette étude, les échantillons des patients tuberculeux admis pour retraitement qui ont été reçus au LRM pendant la période d'étude.

Dès réception au LRM, un des deux échantillons était soumis le lendemain ou au plus tard le jour ouvré suivant au test Xpert/MTB/RIF encore appelé GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA). Le deuxième échantillon était mis en culture sur milieu de Lowenstein Jensen. Lorsque la culture était positive, les colonies étaient raclées dans des aliquots et gardées à -80°C. Ensuite, le test de biologie moléculaire Genotype CM/AS assay (Hain Life science, Nehren, Germany) était utilisé sur les colonies pour identifier les MNT. Les patients pris en charge pour une tuberculose multirésistance ou résistante à la rifampicine ont été exclus de cette étude.

Variables étudiées

Les variables étudiées étaient : le sexe, l'âge, le type de retraitement, le statut sérologique VIH, le département de provenance des échantillons, le résultat du GeneXpert ainsi que les résultats du Hain test AS/AC lorsque la culture était positive.

Considérations éthiques

L'autorisation de la coordination du PNT a été obtenue pour l'étude. Il n'était pas possible de recueillir l'avis du comité national d'éthique vu le caractère rétrospectif de la collecte des données. Toutes les dispositions ont été prises pour garantir la confidentialité des données.

Saisie et Analyse des données

Les données ont été saisies et analysées à l'aide des logiciels SPSS Statistics21. Les caractéristiques des patients MNT ont été comparées à celles des patients tuberculeux (MT) avec un seuil de significativité fixé à 5%.

RESULTATS

Description de la population d'étude

Sur les 224 patients admis en retraitement en 2014, les échantillons de 214 (95%) ont été reçus au LRM. Plus de la moitié des échantillons provenait des départements de l'Atlantique/Littoral (sud Bénin). Les patients étaient majoritairement de sexe masculin (77,5%). Un patient sur trois (64,7%) était admis pour rechute et la séroprévalence du VIH était de 20% (Tableau I).

Tableau I. Caractéristiques de la population des patients admis pour retraitement en 2014 au Bénin (N=224)

	n	%
Département		
Atacora-Donga	2	2,0
Atlantique-Littoral	54	52,9
Borgou-Alibori	3	2,9
Mono-Couffo	18	17,6
Ouémé-Plateau	16	15,7
Zou-Collines	9	8,8
Sexe		
Masculin	79	77,5
Féminin	23	22,5
Tranche d'âge (en année)		
15-24	11	10,8
25-34	25	24,5
35-44	34	33,3
45-54	19	18,6
55-64	9	8,8
65 et +	4	3,9
Type de patient		
Rechute	66	64,7
Echec	28	27,5
Reprise	5	4,9
MDR	3	2,9
Sérologie VIH		
Positive	17	20,0
Négative	68	80,0

Caractéristiques comparées des patients : culture positive vs culture négative

Sur les 214 échantillons, la culture était positive dans 123 cas (58%), négative dans 85 cas (40%) et contaminée dans 6 cas (2%). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative selon l'âge, le sexe et le résultat du GeneXpert entre les patients à culture positive et ceux à culture négative. Par contre, les échantillons à culture positive provenaient plus souvent des cas de rechutes (66,9%) alors que les échantillons à culture négative provenaient plus souvent des cas d'échecs (53,1%), $p=0,0001$ (Tableau II).

Tableau II. Caractéristiques comparées des patients admis pour retraitement en 2014 au Bénin: culture positive vs culture négative

	Culture		p
	Positive, n=123 (%)	Négative, n=85 (%)	
Sexe			0,944
Masculin	95 (77,2)	66 (77,6)	
Féminin	28 (22,8)	19 (22,4)	
Age moyen	40 ± 12 ans	40 ± 12 ans	> 0,999
Type de patient*			0,0001
Rechute	81 (66,9)	38 (46,9)	
Echec	32 (26,5)	43 (53,1)	
Reprise	8 (6,6)	0 (0,0)	
Résultat Xpert			0,587
Négatif	9 (7,3)	8 (9,4)	
Positif	114 (92,3)	77 (90,6)	

*Données manquantes : Groupe culture positive : 02 ; Groupe culture négative : 04

Prévalence des MNT

Sur les 123 cas de culture positive, les MNT étaient mis en évidence dans 10 cas, soit une prévalence de 8,1%, IC95% [3,3%-13,1%].

Mycobacterium. intracellulare (trois cas) et *Mycobacterium species* (trois cas) étaient les MNT les plus retrouvées. *Mycobacterium avium* était retrouvé dans un cas. Dans deux cas, la mycobactérie n'a pu être identifiée par le test Hain utilisé (tableau III).

Dans deux cas (20%), une coexistence d'une MNT et de *M. tuberculosis* était notée.

Tableau III. Résultats du test Hain CM/AS Assay sur les cultures positives des échantillons des patients admis pour retraitement en 2014 au Bénin (N=123)

Mycobactéries	n	%
<i>M. tuberculosis</i>	113	91,9
Mycobactéries non tuberculeuses	10	8,1
<i>M. intracellulaire</i>	3	2,4
<i>M. species</i>	3	2,4
Non identifiable par CM	2	1,6
Bactérie gram+ G-C	1	0,8
<i>M. avium</i>	1	0,8

Facteurs associés à la présence de MNT

Ni le sexe, ni l'âge n'étaient associés à la présence de MNT. Seul le statut sérologique VIH positif était associé à la présence de MNT. En effet, la prévalence du VIH chez les patients avec *M. tuberculosis* était de 11,3% alors qu'elle était 60% parmi les patients porteurs de MNT, $p=0,003$ (tableau IV).

Tableau IV. Facteurs associés à la présence des MNT dans les échantillons des patients admis pour retraitement au Bénin en 2014

	M. tubercu- losis n=112 (%)	Mycobacté- ries non tu- berculeuses n=10 (%)	p
Age moyen	39 ±11 ans	47 ± 14 ans	0,055
Sexe			0,773
Masculin	88 (78,6)	7 (70,0)	
Féminin	24 (21,4)	3 (30,0)	
Type de patient			0,555
Rechute	75 (67,0)	5 (50,0)	
Echec	30 (26,7)	4 (40,0)	
Reprise	7 (6,3)	1 (10,1)	
Sérologie VIH			0,003
Positive	12 (11,3)	6 (60,0)	
Négative	94 (88,7)	4 (40,0)	

DISCUSSION

Un biais possible de ce travail pourrait être la faible positivité de la culture (58%). Mais l'absence de différence significative lors de la comparaison des caractéristiques des échantillons avec culture positive et ceux avec culture négative, démontre que ce biais s'il existait, reste bien minime ; toute chose qui, permet de généraliser la prévalence de MNT trouvée sur les échantillons à culture positive à l'ensemble des patients inclus.

En Afrique, peu d'études ont été réalisées sur la prévalence des MNT dans les échantillons des patients admis pour retraitement. Maiga et al ont rapporté une prévalence de 18% à Bamako [6]. Okoi et al ont rapporté 16,5% pour les traitements et 7,5% dans les échantillons des cas présumés de tuberculose dans neuf pays d'Afrique [7]. Hoza et al en Tanzanie sur les cas présumés de tuberculose avaient retrouvé une prévalence de 9,1% [8]. Hors d'Afrique, Nasiri et al en Iran ont rapporté une prévalence de 9,1 % chez les cas présumés de tuberculose [9]. Yu X et en Chine quant à eux ont rapporté une prévalence de 6,3% chez les cas présumés de tuberculose [10].

En ce qui concerne les souches isolées, dans une étude multicentrique réalisée sur les échantillons de plus 20000 patients de 62 pays sur six continents, la MNT la plus isolée était le complexe MAC, suivi de *M. gordonae*, *M. xenopi* et *M. kansasii* [11].

Dans la plupart des séries américaines et européennes, *Mycobacterium avium* complexe (MAC) composé de *M. avium* & *M. intracellulaire* constitue l'espèce la plus isolée (1,4). Dans les séries chinoises, le complexe MAC vient en 2^{ème} position après *M. simiae*, suivie de *M. fortuitum* [10]. Pour presque toutes les séries africaines, le complexe MAC vient également en tête [7] comme dans notre étude (4 cas sur 10). Toutefois en Afrique du Sud, dans la majorité des études, *M. kansasii* était la MNT la plus isolée alors qu'elle ne vient qu'en troisième position pour l'ensemble des études publiées en Afrique sub-saharienne [7].

Les raisons de ces variations géographiques ne sont pas encore bien connues, mais les conditions environnementales notamment climatiques semblent jouer un rôle de premier plan dans la distribution des sous-espèces de MNT [7].

La coexistence de MNT et de *M. tuberculosis* a été retrouvée dans 2 cas/10. Ce même constat a été fait par Hoza et al en Tanzanie avec une proportion de 5 cas /36 [8]. La possibilité d'une telle association soulève la question du dépistage en routine des MNT dans nos pays à ressources limitées. Selon nos pratiques actuelles, la présence de MNT est suspectée lorsque chez un malade, la microscopie des crachats est positive alors que le test GeneXpert est négatif. Dans les cas de co-infection, les MNT risquent d'être masquées par la présence d'ADN de *M. tuberculosis* détectée par le test GeneXpert.

L'infection à VIH était le seul facteur associé ($p=0,003$) à la présence de MNT dans notre étude. Ce constat a été également rapporté dans de nombreuses études. Dans la méta-analyse de Okoi et al, près de la moitié des patients qui présentaient une MNT étaient infectés par le VIH [7]. Le VIH est connu pour être un facteur de risque de MNT et les infections opportunistes dues au MAC sont particulièrement fréquentes dans ce type de population notamment lorsque les taux de CD4 sont bas [1].

Toutefois, retrouver une MNT dans un échantillon respiratoire ne signifie pas forcément infection pulmonaire à MNT. Afin de distinguer entre colonisation et infection pulmonaire, l'American Thoracic Society (ATS) a publié des recommandations qui exigent la présence de signes cliniques évocateurs, des signes radiologiques compatibles et la mise en évidence de la même mycobactérie sur deux échantillons différents [2]. La non prise en compte de ces critères diagnostiques constitue la principale limite de notre étude qui ne permet pas de distinguer entre les colonisations et les infections pulmonaires à MNT. Malgré ses limites, cette étude a démontré l'existence des MNT dans les échantillons des patients admis pour retraitement au Bénin et a permis d'avoir des données préliminaires qui seront encore mieux étayées dans de prochaines études.

CONCLUSION

La prévalence des MNT dans les échantillons des patients admis pour retraitement en 2014 au Bénin était de 8,1% avec comme facteur associé le statut VIH+. Le complexe MAC est l'espèce la plus fréquemment isolée. La co-infection MNT-*M. Tuberculosis* est retrouvé dans 20% des cas de MNT (2/10).

RÉFÉRENCES

1. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2012 Dec;6(6):597–612; quiz 613. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23234447>
2. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367–416.
3. Koh W-J, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. *Korean J Radiol* [Internet]. 2002;3(3):145–57. Available from: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714412&tool=](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)

- pmcentrez&rendertype=abstract
4. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott B a, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Feb 15 [cited 2014 Mar 22];175(4):367–416. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277290>
5. World Health Organisation. Definitions and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision [Internet]. World Health Organisation. 2014. 9-11 p. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79199/1/9789241505345_eng.pdf
6. Maiga M, Siddiqui S, Diallo S, Diarra B, Traoré B, Shea YR, et al. Failure to recognize nontuberculous mycobacteria leads to misdiagnosis of chronic pulmonary tuberculosis. Hozbor DF, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Apr 28];7(5):e36902. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0036902>
7. Okoi C, Anderson STB, Antonio M, Mulwa SN, Gehre F, Adetifa IMO. Nontuberculous Mycobacteria isolated from Pulmonary samples in sub-Saharan Africa - A Systematic Review and Meta Analyses. *Sci Rep* [Internet]. 2017;(September):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12175-z>
8. Hoza AS, Mfinanga SGM, Rodloff AC, Moser I, König B. Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern , Tanzania : public health and diagnostic implications for control programmes. *BMC Res Notes*. 2016;1–9.
9. Nasiri MJ, Dabiri H, Darban-Sarokhalil D, Hashemi Shahraki A. Prevalence of Non-Tuberculosis Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Iran: Systematic Review and Meta-Analysis. Hasnain SE, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun 8 [cited 2017 Nov 24];10(6):e0129073. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052701>
10. Yu X, Liu P, Liu G, Zhao L, Hu Y, Wei G, et al. The prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections in mainland China: Systematic review and meta-analysis. *J Infect* [Internet]. 2016 Dec [cited 2017 Nov 24];73(6):558–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27717784>
11. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Ängeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J* [Internet]. 2013 Dec [cited 2017 Dec 5];42(6):1604–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598956>