

# Diversité génotypique de *Mycobacterium tuberculosis* dans la région Antilles-Guyane.

I. Filliol, C. Sola, E. Legrand & N. Rastogi

Unité tuberculose & mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, Morne Jolivière, B.P. 484, 97165 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe, France.  
Tél : 00 590-89 76 61 Fax 00 590-89 38 80. E-mail : rastogi@ipagua.gp

Manuscrit n° 2079. "Bactériologie". Reçu le 14 juin 1999. Accepté le 15 septembre 1999.

**Summary:** Genotypic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in French West Indies and Guiana.

This investigation dealt with 226 strains (1 isolate/patient) of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the French West Indies and French Guiana over a three-year period (1994-1996). The genotypic diversity of the isolates was investigated using various molecular markers; essentially two PCR-based rapid methods, namely spoligotyping and double-repetitive-element (DRE)-PCR, as well as three restriction fragment length polymorphism (RFLP)-based methods, namely IS6110-RFLP, DR-RFLP and PGRS-RFLP. Out of 226 isolates investigated, a total of 166 isolates were distributed in 31 spoligo type-defined clusters containing 2-31 strains, which corresponded to a rate of 73% of primary clustering. After secondary typing with DRE-PCR, IS6110-RFLP, DR-RFLP and/or PGRS-RFLP, molecular clonality was established for 73 isolates organised in 25 clusters (32% of clustered isolates). Considering one reactivation case per cluster, the rate of recent transmission was estimated to a minimal rate of 21%, however the available epidemiologic information led to the positive conclusion for only 14% of cases. The data obtained demonstrated the presence of common genotypes of *M. tuberculosis* among the three overseas French territories, i.e. Guadeloupe, Martinique and French Guiana. The results obtained during this retrospective study clearly indicate the importance of future prospective epidemiological investigations around the clustered cases of tuberculosis, so as to detect the persisting foci of endemic disease and characterize the chain of transmission as well as the sub-populations which are at an increased risk of contracting and/or propagating the disease. Last but not least, the present study also deals with a first phylogenetic approach of *M. tuberculosis* based on a comparison of the spoligotyping results obtained locally with those reported elsewhere in the world.

**Résumé :**

Cette étude a porté sur 226 souches (1 isolat/patient) de *Mycobacterium tuberculosis* isolées dans la région Antilles-Guyane pendant une période de trois ans (1994-1996). La diversité génotypique des souches a été étudiée en utilisant différents marqueurs moléculaires; il s'agit essentiellement de deux méthodes rapides basées sur l'amplification génique (spoligotyping et PCR d'éléments répétitifs doubles ou DRE-PCR), ainsi que trois méthodes de caractérisation de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (IS6110-RFLP, DR-RFLP et PGRS-RFLP). Sur les 226 souches typées, un total de 166 souches distribuées dans 31 grappes contenant de 2 à 31 souches a été retrouvé, soit un taux primaire de souches en grappes de 73%. Après typage secondaire par les méthodes DRE-PCR, IS6110-RFLP, DR-RFLP et/ou PGRS-RFLP, la clonalité a été établie pour 73 souches réparties en 25 grappes, soit un taux de 32% de cas en grappes. En comptant un cas de réactivation par grappe, le taux de transmission récente serait au minimum de 21%. Toutefois, les données épidémiologiques disponibles ne permettent de conclure que pour 31/226, soit 14% des cas. Les résultats obtenus démontrent la présence de génotypes communs entre Guyane, Guadeloupe et Martinique, et soulignent l'intérêt de réaliser, dans les années à venir, des études épidémiologiques prospectives classiques autour des cas "en grappe". Ces études permettraient de mieux cerner les filières de transmission de la tuberculose et les populations les plus à risque de transmettre la maladie dans la région Antilles-Guyane. Une proposition de phylogénie de *M. tuberculosis* par comparaison des spoligotypes obtenus dans la région Antilles-Guyane avec ceux décrits ailleurs dans le monde est également présentée.

*tuberculosis*  
*Mycobacterium tuberculosis*  
transmission  
genotype  
Molecular epidemiology  
Phylogeny  
Caribbean  
French Guiana  
South America

*tuberculose*  
*Mycobacterium tuberculosis*  
transmission  
génotype  
épidémiologie moléculaire  
phylogénie  
Antilles-Guyane  
Amérique du sud

## Introduction

La réémergence de la tuberculose dans le monde a entraîné la recherche de nouvelles méthodes pour étudier la dynamique de transmission de cette maladie. Les techniques de typage moléculaire ont montré qu'entre 30 et 50 % des cas de tuberculose des zones urbaines étaient le fait de cas "en grappes" (16), ce qui suggère une transmission récente, pro-

portion très supérieure aux 10 % de transmission récente estimés avant la réémergence pour les pays développés (11). L'incidence de la tuberculose dans une communauté est liée à la fois au taux de réactivation et au nombre de cas de tuberculose d'acquisition récente. En Guadeloupe, nous avons suggéré que, pour la période 1994-1996, environ un tiers des cas de tuberculose était de transmission récente (19). Aux États-Unis, des observations identiques ont été faites dans des zones

géographiques où des expériences de traitement par observance directe ont pourtant été conduites depuis 15 ans (1). Dans ce récent travail, les auteurs attribuent le maintien d'un niveau élevé de transmission récente de la tuberculose à l'existence de certains quartiers urbains socio-économiquement défavorisés, qui constituent des noyaux de population difficilement accessibles aux stratégies de prévention classiques et nécessitent la mise en place de moyens spécifiquement adaptés (1). Une transmission accrue de la tuberculose chez les personnes sans domicile fixe a également été rapportée à Paris (8). On trouve dans la région Antilles-Guyane des conditions similaires qui pourraient justifier la mise en place de nouvelles méthodes de prévention de la tuberculose plus adaptées aux situations locales (17).

Nous avons rapporté pour la période 1994-1996 l'état de la situation épidémiologique de la tuberculose dans la région Antilles-Guyane décrite d'une part par les méthodes de l'épidémiologie classique (14, 15) et d'autre part à l'aide des méthodes de l'épidémiologie moléculaire (17, 18). Dans ce travail, nous présentons de nouveaux résultats de typage moléculaire pour l'ensemble de la région Antilles-Guyane ainsi que les problématiques épidémiologiques que ces résultats soulèvent. Les outils employés permettent de déterminer l'origine d'un génotype donné de *Mycobacterium tuberculosis* et d'étudier la dynamique de son évolution dans le contexte de la circulation globale des souches de *M. tuberculosis*.

## Matériel et méthodes

### Population d'étude

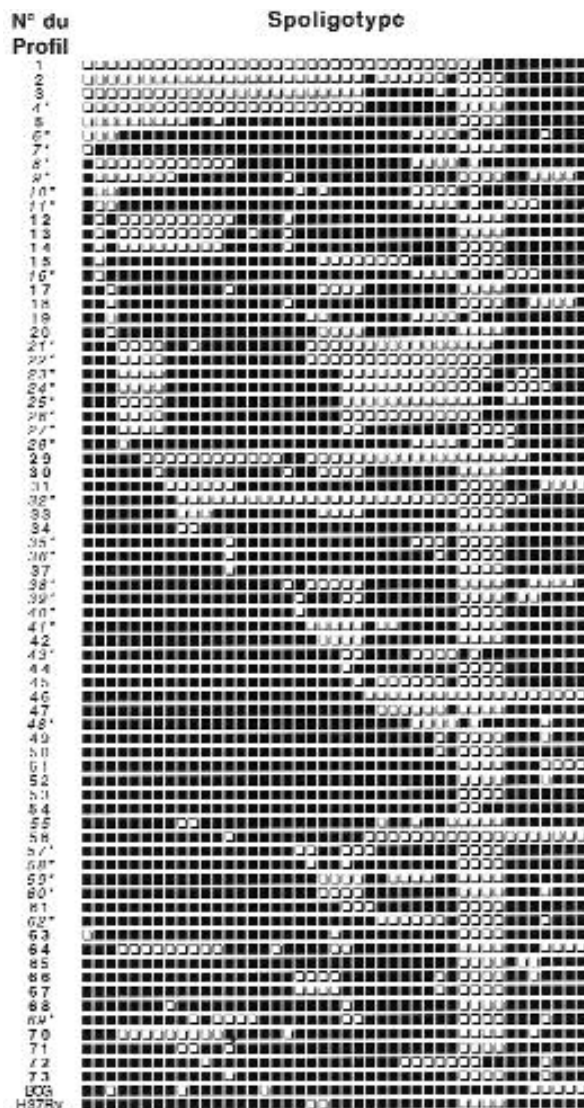
La population étudiée compte un million d'habitants répartis entre Guadeloupe (428 000 habitants), Martinique (392 000 habitants) et Guyane française (163 000 habitants, estimations INSEE, 1997). L'incidence de la tuberculose en Guadeloupe et en Martinique est actuellement de l'ordre de 10 cas pour 100 000 habitants et elle est 4 fois plus élevée en Guyane française (14, 17). La répartition des cas de tuberculose varie notamment de façon importante en fonction de la nationalité. Alors qu'environ 75% des cas de tuberculose en Guadeloupe et Martinique sont le fait de sujets nationaux, ce taux n'est que de 40% pour la Guyane française (14, 17). Nous avons caractérisé un total de 226 isolats cliniques de *M. tuberculosis* représentant 226 patients (100 domiciliés en Guadeloupe, 76 en Guyane française, 34 en Martinique et 16 en provenance d'autres territoires) pour lesquels les souches ont été isolées et/ou identifiées dans notre laboratoire situé à l'Institut Pasteur de Guadeloupe. Pour chaque patient, un seul isolat a été étudié. Pour plus de détails sur les caractéristiques de la population, le lecteur est prié de se référer à l'étude précitée (14).

### Méthodes moléculaires

Les principales méthodes de génotypage employées sont celles décrites récemment (5, 10, 12, 22). Il s'agit essentiellement de deux méthodes rapides basées sur l'amplification génique (spoligotyping et PCR d'éléments répétitifs doubles ou DRE-PCR), ainsi que deux méthodes de caractérisation de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (IS6110-RFLP et PGRS-RFLP). Actuellement, le standard international de qualité est la méthode IS6110-RFLP (22) dont les limites d'application sont les souches à faible nombre de copies ou les souches dépourvues de cet élément. Dans ce dernier cas, il est recommandé de caractériser les souches par

Figure 1.

Nomenclature de la base de données des spoligotypes.  
Nomenclature of the spoligotyping data base.



Nomenclature de la base de données des spoligotypes (1 à 73) obtenue à partir de spoligotypes publiés (n = 393, réf. 17) et obtenus dans cette étude (n = 226). La présence ou l'absence des séquences espaceurs 1 à 43 est représentée par un carré plein (hybridation positive) ou vide (pas d'hybridation) et de gauche à droite. Les profils présents à la fois dans la région Antilles-Guyane et ailleurs sont en caractères normaux. Les profils en caractères gras sont ceux trouvés uniquement dans la région Antilles-Guyane pour l'instant. Les profils en italique et avec étoile représentent ceux déjà publiés ailleurs mais absents de la région Antilles-Guyane.

au moins deux méthodes, de préférence par l'association IS6110-RFLP-PGRS-RFLP (9, 21) qui est plus efficace en terme de discrimination que l'association spoligotyping-IS6110-RFLP (3, 6, 7). Ce choix de méthodes demeure néanmoins très lourd en routine. Nous utilisons l'association "spoligotyping+DRE-PCR", qui permet de détecter la majorité des liens épidémiologiques à moindre coût (18). Nous confirmons ensuite les grappes ainsi mises en évidence par IS6110- et/ou PGRS-RFLP pour les souches présentant moins de 5 copies de IS6110 (17, 19).

### Analyse des génotypes de *M. tuberculosis*

Les résultats de typage ont été analysés à l'aide des logiciels Excel (Microsoft, USA), Taxotron (Institut Pasteur, Paris) et Gel compar (Applied Maths, Belgique). Excel permet une

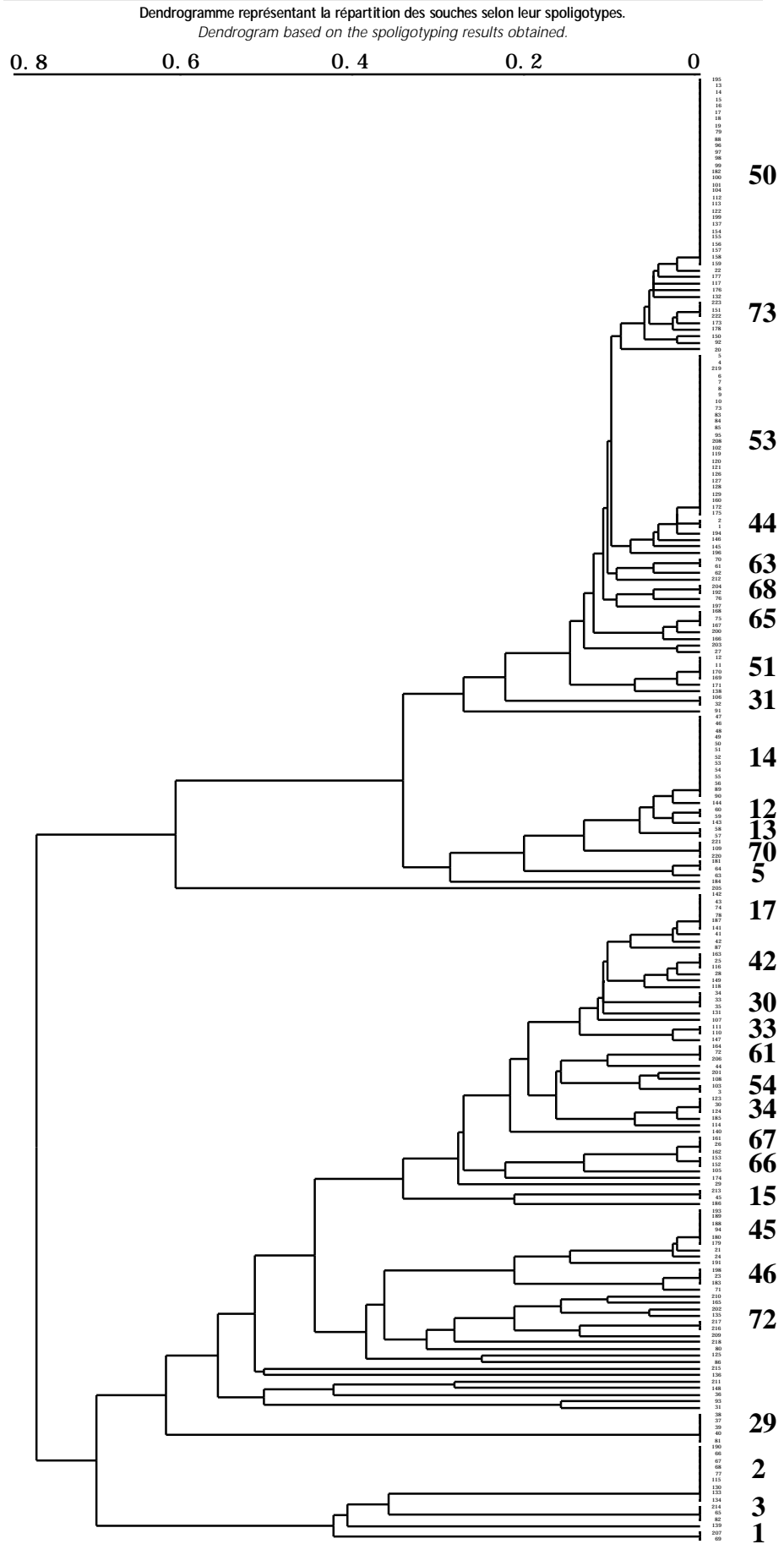
comparaison rapide entre tout nouveau résultat expérimental et l'ensemble des données disponibles de spoligotyping, tandis que Taxotron et Gel-compar permettent une approche phylogénétique de la comparaison entre les souches décrites (dendrogrammes). Les résultats de spoligotyping obtenus au laboratoire ainsi que ceux rapportés dans la littérature pour le reste du monde ont été incorporés dans une base de données. La nomenclature présentée dans cet article ne retient que les isolats pour lesquels au moins deux cas sont décrits. À l'heure actuelle, nous décrivons 73 spoligotypes partagés par plus d'un isolat, numérotés de 1 à 73. Ces spoligotypes ainsi que les profils types trouvés chez *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* BCG sont représentés dans la figure 1.

### Résultats

#### Analyse de la distribution des spoligotypes et spécificité géographique

La structure globale de la population de *M. tuberculosis* par spoligotyping est illustrée dans la figure 2 et les résultats obtenus par année et par origine sont décrits dans le tableau I. Ces résultats donnent des informations importantes sur le flux inter-régional des souches. En ce qui concerne l'ensemble de la région Antilles-Guyane, sur trois ans, 4 génotypes regroupant 50 % des patients (83 cas) ont été isolés tous les ans depuis 1994; il s'agit des spoligotypes 2, 14, 50 et 53. Par conséquent, ces types ne sont pas d'introduction récente dans la région Antilles-Guyane. Nous avons également comparé la distribution relative des spoligotypes les plus fréquents (50 et 53) entre une population de souches de la région Antilles-Guyane isolées entre 1994 et 1997 (n = 300) et une population de souches décrite dans la littérature et d'origines diverses (n = 554). Nos résultats démontrent que le spoligotype 50 est relativement plus fréquent dans la région Antilles-Guyane que dans le reste du monde (11,33 % versus 6,5 %, erreur-type  $d/s_d$  par test d'homogénéité de deux échantillons = 2,46 ; coefficient de sécu-

Figure 2.



rité de 95 %), alors que le spoligotype 53 est également réparti dans les deux zones (11 % versus 10,5 %; erreur-type  $d/s_d = 0,23$ ; coefficient de sécurité de 95%). Par ailleurs, les deux autres spoligotypes majeurs dans notre région (11 cas pour le spoligotype 2 et 15 cas pour le spoligotype 14) sont pratiquement absents dans le reste du monde (3 cas pour le spoligotype 2 et 0 cas pour le spoligotype 14). Ces résultats suggèrent une forte spécificité géographique pour les spoligotypes 2, 14 et 50 pour la région Antilles-Guyane. De plus, le type 50 est plus fortement représenté en Guyane française (20 cas sur 31 pour l'ensemble de la région). Trois de ces types (types 2, 50, 53) sont présents dans les trois départements étudiés, mais aucun cas de type 14 n'a encore été trouvé en Martinique (tableau 1). Par ailleurs, le type 17 présent dans les trois territoires (7 cas au total), a récemment été décrit à Cuba (3); absent dans le reste du monde, il pourrait s'agir d'un génotype prévalent en Amérique latine. Huit autres spoligotypes (types 5, 63, 66, 67, 68, 70, 72, 73) décrits dans cette étude n'ont pas été rapportés ailleurs et totalisent 17 cas. Il pourrait s'agir de souches circulant localement. Dix spoligotypes (types 2, 11, 20, 31, 42, 46, 49, 51, 61, 65) trouvés dans la région Antilles-Guyane totalisent 32 cas et ont été également décrits en France métropolitaine précédemment (6). Leur présence commune entre ces deux territoires pourrait indiquer une chaîne de transmission due à des mouvements de populations (historiques et/ou actuels); leur évolution dans les années à venir devrait permettre d'accéder à une meilleure compréhension de ces phénomènes. D'autres types

(spoligotypes 3, 19, 33, 34, 36, 37, 45, 47, 50, 52, 53) présents dans notre région totalisent 76 cas et ont été décrits récemment par des équipes hollandaises ou anglaises (7, 10). Ces observations soulèvent la question de leur introduction dans la région Antilles-Guyane; une introduction de ces types par l'intermédiaire du Surinam ou de la Caraïbe anglophone ne peut être exclue.

En conclusion, les mini-épidémies de tuberculose dans notre région influent évidemment sur la fréquence des spoligotypes recensés, ce qui permet de faire à la fois un criblage des souches potentiellement liées et de faire une comparaison de spécificité géographique par rapport aux profils présents dans notre banque de spoligotypes. Toutefois, les mini-épidémies n'influent pas sur les profils inclus dans la base de données (figure 1) puisqu'il s'agit de ne retenir que les isolats pour lesquels au moins deux cas sont décrits indépendamment de leur origine géographique. Comme le spoligotyping ne permet qu'un criblage initial des souches potentiellement liées, les souches en grappes doivent être obligatoirement typées par d'autres méthodes complémentaires comme décrit ci-dessous.

### Résultats de l'analyse génotypique par méthodes complémentaires et données épidémiologiques

Les résultats de typage moléculaire obtenus par spoligotyping sont présentés dans la tableau I par année et par origine, et les résultats de typage complémentaire par IS6110-RFLP, DR-RFLP et DRE-PCR (éventuellement PGRS-RFLP comme méthode de confirmation) et les données épidémiolo-

Tableau I.

Résultats de typage moléculaire obtenus par spoligotyping par année et par origine.  
Yearly distribution of spoligotyping patterns for strains according to their geographical origin.

spoligo types	total 94-96	1994					1995					1996					grappes IS6110	clonalité établie pour n° d'isolats
		Gp	Mt	Gf	autres	total	Gp	Mt	Gf	autres	total	Gp	Mt	Gf	autres	total		
1	2				1	1	1											non
2	11	2				2					1	1	5		7	J	oui (11)	
3	3				1	1	1				1				1	P	oui (3)	
5	2							1				1			1	X	oui (2)	
11	1												1		1		NA*	
12	2	2				2										A	en cours	
13	2	2				2										A	oui (2)	
14	15	7				7	4		1		5	3			3	A	en cours	
15	2	2				2										C	oui (2)	
17	7	2				2						2	1	2	5	N	oui (2)	
19	1				1	1											NA	
20	1						1				1						NA	
29	5	4				4						1			1	B	oui (5)	
30	2	2				2										H	oui (2)	
31	2	1				1											non	
33	2													1	1		non	
34	3	1				1								2	2		non	
36	1													1	1		NA	
37	1											1			1		NA	
42	4	1				1						1		2	3		non	
44	2											2			2		en cours	
45	6										1	5			6	Y	oui (2)	
46	3						1					2			2		en cours	
47	1	1				1											NA	
49	1												1		1		NA	
50	31	4				4	4				4	1	2	20	23	E, F, M	oui (13)	
51	5	2				2								3	3	D	oui (2)	
52	1												1		1		NA	
53	26	4		2	6	3	3				3	5	2	10	17	K, T	oui (6)	
54	2															I	oui (2)	
61	2											1		1	2		en cours	
63	2	1				1						1			1	R	oui (2)	
65	2											1		1	2		en cours	
66	2													2	2	U	oui (2)	
67	3	1				1								2	2	G	oui (2)	
68	2												1		1		en cours	
70	2													2	2	V	oui (2)	
72	2	1				1			1		1					I	oui (2)	
73	2				1	1								1	1	W	oui (2)	
total	166	40			6	46	17	1	2		20	23	16	58	1	98		oui (n=73)

Gp :Guadeloupe ;Mt :Martinique ;Gf :Guyane française ;autres :Caraïbes divers.

\*NA :non-applicable (grappe établie avec des isolats d'autres régions du monde d'après les résultats de spoligotyping publiés)

Tableau II.

Résultats du typage moléculaire de *M. tuberculosis*, origine des patients et données épidémiologiques disponibles.  
*Molecular typing results of M. tuberculosis, geographical origin of patients and available epidemiological data.*

spoligo type n° (méth.1)	n° de souches du type	nb de souches typées par :			résumé des résultats obtenus par méthodes de typage moléculaire	données épidémiologiques et cliniques, origine, observations
		IS6110 RFLP méth.2	DR RFLP méth.3	DRE PCR méth.4		
1	2	2	2	2	différent par méth.2, profils IS6110 Beijing	trouvé au Surinam et en Guadeloupe
2	11	11	2	11	pas de sous-grappes par PGRS: souches identiques par méth.2 et 4, IS-type J	2 patients de l'hôpital A et 2 de B, + 2 patients même patronyme
3	3	3	1	3	2 souches identiques par méth.2,3 et 4, IS-type P	trouvé au Surinam et en Guadeloupe (2 patients de l' hôpital A)
5	2	1	1	2	2 souches identiques par méth.2,et 4, IS-type X	trouvé en Martinique et en Guadeloupe, pas de lien épidémiologique évident
12	2	2	2	2	un espaceur de différence avec le type 14, identiques par méth.2 et 3, IS-type A	profil très commun, représente des cas de réactivation et de transmission
13	2	2	2	2	un espaceur de différence avec le type 14, identique par méth.2 et 3, IS-type A	suspicion de contamination croisée (patients prélevés à 3 jours d'intervalle)
14	15	15	13	14	identique par méth.2 et 3, résultats par méth.4 non concluants, IS-type A	profil très commun, représente des cas de réactivation et de transmission
15	2	2	2	2	souches identiques par méth.2,3 et 4, IS-type C	grappe d'importation probable (Surinam ou République dominicaine)
17	7	7	1	7	3 sous-grappes par PGRS:17B: 2 souches identiques par méth.2,3 4, IS-type N	17B trouvé chez 2 patients de Guadeloupe (hôpital B)
29	5	5	4	5	souches identiques par méth.2,3 et 4, IS-type B	3/5 patients de Guadeloupe hospitalisés dans le même hôpital B
30	2	2	2	2	souches identiques par méth.2,3 et 4, IS-type H	2 patients de la même région en Guadeloupe
31	2	2	1	2	souches différentes par méth.2 et 4	trouvé en Guyane française et en Guadeloupe, pas de lien épidémiologique
33	2	2	2	2	souches différentes par méth.2,3 et 4	trouvé en Guyane française, pas de lien épidémiologique
34	3	3	1	3	2 souches identiques par méth.2 et 4*	patients de Guyane française, suspicion de lien épidémiologique
42	4	4	1	4	souches différentes par méth.2 et 4	Guadeloupe (2 patients) et Guyane française (2 patients), pas de lien
44	2	2	2	2	souches identiques par méth.2,3 et 4*	un couple de patients de Saint-Martin
45	6	5	ND	6	2 souches identiques par méth.2 et 4, IS-type Y	5 patients de Martinique, 1 de Guadeloupe (en cours d'investigation)
46	3	1	ND	3	2 souches identiques par méth. 4	trouvé en Martinique et en Guadeloupe (en cours d'investigation)
50**	31	22	14	28	sous-grappes par méth.2,4 et PGRS, IS-type E (3 cas) F (2 cas) et M (3 cas)	génotype d'importation probable (Haïti)
51	5	5	2	5	2 souches identiques par méth.2 et 4, IS-type D	génotype d'importation probable (Haïti)
53**	26	10	8	20	sous-grappes par méth.2,4 et PGRS, IS-type K (2 cas) et T (3 cas)	patients de la grappe T du même hôpital A en Guadeloupe
54***	2	2	2	2	souches identiques par méth.2,4 et PGRS, IS-type L***	2 patients hospitalisés dans le même service de l'hôpital C
61	2	2	1	1	souches identiques par méth.2 et PGRS-RFLP*	trouvé en Guyane française et en Guadeloupe
63	2	2	1	2	souches identiques par méth.2 et 4, IS-type R	2 patients de l'hôpital A (Guadeloupe)
65	2	1	ND	2	souches identiques par méth. 4	trouvé uniquement en Guyane française
66	2	2	ND	2	souches identiques par méth.2 et 4, IS-type U	lien familial (Guyane française)
67	3	3	ND	2	souches identiques par méth.2 et PGRS-RFLP, IS-type G	trouvé uniquement en Guyane française
68	2	1	ND	1	en cours d'investigation	présent en Martinique et à la Barbade
70	2	2	ND	2	souches identiques par méth.2,4, IS-type V	trouvé uniquement en Guyane française
72	2	2	2	2	souches identiques par méth.2,3,4, IS-type I	trouvé uniquement en Guyane française
73		2	ND	2	souches identiques par méth.2 et 4, IS-type W	présent au Surinam et en Guyane française

Note : Les grappes primaires ont été définies par spoligotyping (numéros 1 à 73). Sur 226 isolats typés initialement, un total de 166 isolats ont été groupés en 39 grappes primaires parmi lesquelles 8 grappes ne contenaient qu'un seul isolat issu de la région Antilles-Guyane (spoligotypes 11,19,20,36,37,47,49,52 ; voir tableau I). Les 31 grappes ont été ensuite analysées par une ou plusieurs méthodes de typage complémentaires : IS6110-RFLP (méth.2), DR-RFLP (méth.3), DRE-PCR (méth.4) et éventuellement PGRS-RFLP.

\*IS-type non attribué (nomenclature en cours) ; \*\* profils de spoligotypes non informatifs parce que fréquents ;

\*\*\*sujet à caution ; cas unique sur l'ensemble des souches étudiées car ces 2 isolats n'hybrident pas avec la sonde DRr par la méthode 3.

logiques disponibles sont illustrés dans le tableau II. Les grappes obtenues par la méthode de référence IS6110-RFLP sont illustrées dans la figure 3. Sur les 226 souches typées, un total de 166 souches distribuées dans 31 grappes contenant de 2 à 31 souches a été retrouvé, soit un taux primaire de souches en grappes de 73%. Après typage secondaire par la méthode de DRE-PCR, IS6110-RFLP, DR-RFLP et/ou PGRS-RFLP, la clonalité a été établie pour 73 souches réparties en 25 grappes, soit un taux de 32 % de cas en grappes. Ces grappes représentent le reflet de liens épidémiologiques potentiels. En supposant qu'il existe un cas de réactivation par grappe identifiée (19), le taux de transmission récente serait égal à 21% (73-25 soit 48 cas) en ce qui concerne une estimation minimale. Malheureusement, compte tenu de la rétroactivité de cette étude, il n'a pas été possible de corréler la clonalité moléculaire avec la transmission récente pour tous les cas en grappes. Ainsi, les données épidémiologiques disponibles (tableau II) ne permettent que de corroborer les liens potentiels pour 34/226, soit 15 % des cas. Ces données montrent clairement que le spoligotyping utilisé seul surévalue considérablement la proportion de cas potentiellement liés et soulignent l'intérêt du typage secondaire de grappes par d'autres marqueurs comme IS6110-RFLP et PGRS-RFLP.

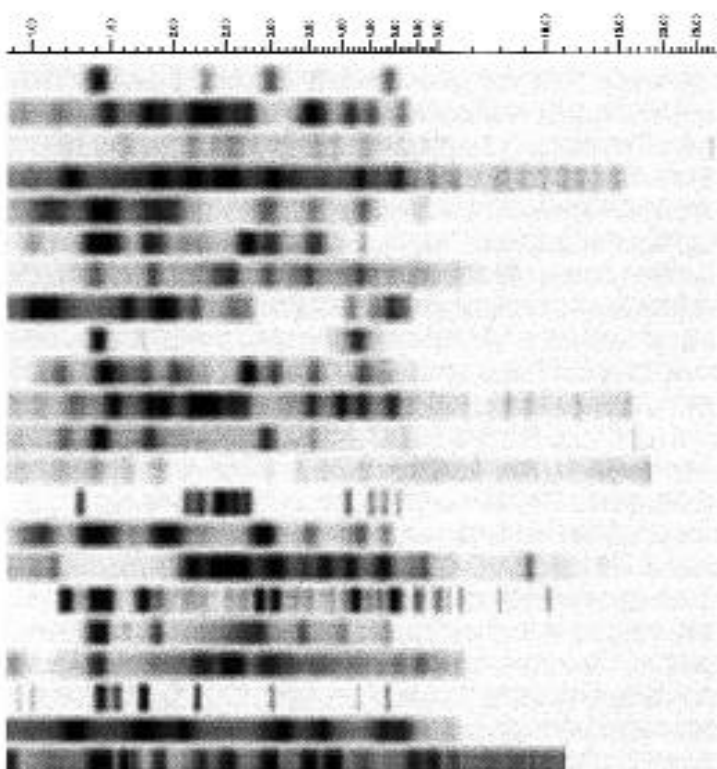
La détection de grappes s'est révélée plus difficile en Guyane qu'en Guadeloupe et en Martinique et on n'y détecte pas de grappes majeures, contrairement aux îles. En effet, contrairement à un modèle purement insulaire avec un passé à forte incidence (souches ancestrales ayant perduré) dans les îles, la tuberculose en Guyane représente essentiellement un milieu ouvert avec des flux migratoires importants en provenance de pays à forte incidence comme le Brésil, Haïti et le Surinam (14, 17), ce qui pourrait expliquer la présence de nombreux foyers et une forte diversité génétique des souches circulantes.

### Analyse phylogénétique par comparaison des spoligotypes obtenus avec une base de données

Les 73 spoligotypes partagés par plus d'un isolat dans notre base de données (numérotés de 1 à 73 ainsi que *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* BCG représentés dans la figure 1) ont été comparés deux à deux par le calcul de l'indice de "1-Jaccard" (17). La matrice de distance a été ensuite analysée par la méthode de "neighbour-joining" à l'aide du logiciel Taxotron comme décrit précédemment (17). L'arbre ainsi obtenu est représenté dans la figure 4. Dans cette figure, certaines branches (A à G) montrent les spécificités suivantes : les

Figure 3.

Les profils IS6110 des différentes grappes décrites.  
IS6110 profiles of the clusters observed.



Les profils IS6110 des différentes grappes décrites (A à Y) obtenus avec le logiciel Gel compar ; échelle, poids moléculaires en kbp.

branches A, B et F sont exclusivement trouvées dans la région Antilles-Guyane et représentent 23 % des souches typées (respectivement 21/166, 12/166 et 5/166). Les branches C et E ne sont trouvées qu'en Europe, à l'exclusion de 3 cas sur la branche C (cas sporadiques). La branche D concerne des cas partagés uniquement entre les Antilles françaises et la France métropolitaine. La branche G concerne 14 (8,5 %) des cas trouvés dans la région Antilles-Guyane, dont le profil 2 qui semble être caractéristique de l'Amérique latine (17). Par ailleurs, le génotype "Beijing" (profil 1 à l'extrême gauche de la figure ; 23) trouvé majoritairement en Chine semble être le plus divergent.

## Discussion

La région Antilles-Guyane associe plusieurs facteurs de risque favorisant la transmission de la tuberculose. On peut citer une population jeune et active, des conditions de précarité socio-économique, une immigration importante en provenance de pays en voie de développement à forte prévalence de tuberculose et de sida (Haïti, Surinam, Brésil), un taux de séropositivité VIH élevé, ainsi que des mouvements de population assez importants (14). En effet, la Guyane française pourrait être une porte d'entrée pour certains génotypes de *M.tuberculosis* en France métropolitaine

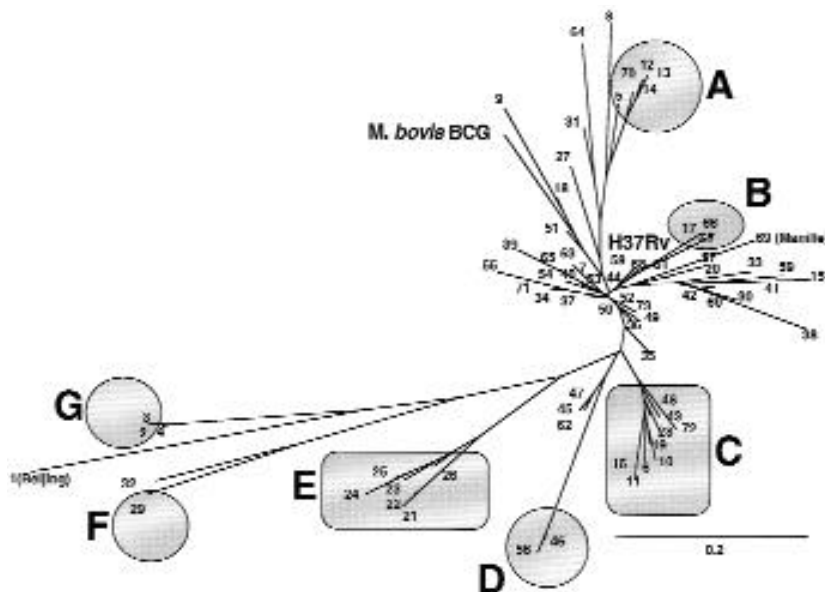
et en Europe, à l'image du Surinam vis-à-vis des Pays-Bas (2). Les entités insulaires, Guadeloupe et Martinique, présentent quant à elles des caractéristiques plus homogènes et plus proches de celles la France métropolitaine, même si elles ne sont pas exemptes de facteurs de risque spécifiques (14, 15, 19). Les outils mis en place à l'Institut Pasteur de Guadeloupe permettent désormais de détecter précocement l'introduction de tout nouveau génotype dans les trois départements français d'Amérique (DFA) par la mise en évidence de grappes (19). Ce modèle géographique est particulièrement riche et propice à l'étude de la diversité des génotypes de *M. tuberculosis* de par les origines multiples de sa population et son passé insulaire.

En se limitant aux données disponibles dans notre base de données, la distribution des spoligotypes régionaux (54/164 cas) représente environ la moitié des spoligotypes présents dans le reste du monde y compris l'Europe (110/164 cas), ce qui souligne une circulation probable entre ces deux régions. Par contre, environ 1/3 des cas représentent des spoligotypes non encore rapportés ailleurs (les branches A, B et F dans la figure 4), et il pourrait s'agir de souches ancestrales ayant été introduites lors de la colonisation. Ces dernières ont pu évoluer localement au cours de l'endémie de la tuberculose, compte tenu de l'incidence très élevée de cette maladie il y a encore quelques années (15).

Récemment, une étude de TEN ASBROEK et coll. (20) a estimé l'intervalle de série et la période d'incubation de la tuberculose par l'étude des empreintes génomiques. D'après cette étude, l'intervalle de série, qui représente le temps écoulé entre la contamination d'un sujet et la transmission à d'autres par ce même sujet, est de 29,5 semaines (IC 95 %, 22,8-38,2), alors que la période d'incubation est de 20,8 semaines (CI 95 %, 15,5-27,8). Dans ces

Figure 4.

Analyse phylogénétique par comparaison des spoligotypes.  
Phylogenetic tree based on the comparison of spoligotypes.



Arbre phylogénétique d'après le calcul de l'index "1-Jaccard" sur les 75 spoligotypes de la figure 1. Les types 1 et 69 ont été nommés respectivement "Beijing" et "Manille" selon la description antérieure de leur spécificité géographique (4,23). La signification des branches A à G est discutée dans le texte.

conditions, notre étude, par son exhaustivité et son suivi (maintenant dans sa cinquième année), nous permet d'affirmer que tous les nouveaux génotypes détectés après 40 semaines du commencement de l'étude représentent des cas importés. De nouveaux génotypes, jusqu'alors inconnus en Guadeloupe, apparaissent régulièrement (résultats non publiés) et sont d'importation récente. Par ailleurs, ces résultats suggèrent dans leur ensemble qu'au moins 21% des cas de tuberculose sont des cas de transmission récente dans la région Antilles-Guyane et qu'il pourrait exister certains cas de transmission inter-régionale (tableaux I et II). Toutefois, la clonalité des isolats n'a pas forcément une signification épidémiologique, ce qui ne peut être démontré que par des enquêtes sur le terrain. À la suite de ces travaux, une étude épidémiologique prospective autour des cas en grappes est entreprise pour les années 1999-2002 pour les 3 DFA et permettra de mieux cerner les filières de transmission de la tuberculose et les populations les plus à risque de transmettre la maladie dans notre région.

Comme on le voit, la mise en place de ce genre d'étude permet d'envisager la circulation globale des souches de *M. tuberculosis* et de suivre l'évolution statistique du nombre de cas associés à un génotype donné, voire de retrouver son origine dans le temps. Nous suggérons que, dans le cas d'une étude exhaustive, étalée sur une longue période, la mise en évidence d'un nouveau profil, jusque-là non identifié localement, témoignerait de l'importation de ce génotype. Ultérieurement, cette étude pourra être étendue sur d'autres îles de la Caraïbe n'ayant pas de laboratoire spécialisé, par la recherche des spoligotypes sur des lames d'examen direct comme l'ont décrit récemment QIAN et coll. (13).

#### Remerciements

Nous remercions F. PFAFF (Institut Pasteur de Guyane française), L. SCHEGEL (Laboratoire départemental d'hygiène, Martinique), P. LEVETT (Queen Elizabeth Hospital, Barbados) et P. PRABHAKAR (Caribbean Epidemiology Center, Trinidad) pour leurs envois de cultures pour identification à l'Institut Pasteur de Guadeloupe, ainsi que F. PRUDENTÉ, M. BERCHEL et K. S. GOH (Institut Pasteur de Guadeloupe) pour leur aide et expertise techniques. Ce projet a été financé par des fonds de recherche provenant de la Délégation générale au Réseau international des Instituts Pasteur et Instituts associés ainsi que de la Fondation française Raoul FOLLEREAU, Paris, France.

## Références bibliographiques

- BISHAI WR, GRAHAM NM, HARRINGTON S, POPE DS, HOOPER N *et al.* - Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy. *JAMA.*, 1998, **18**, 1679-1684.
- BORGENDORFF MW, NAGELKERKE N, VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PE & VAN EMBDEN JDA - Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol*, 1998, **147**, 187-195.
- DIAZ R, KREMER K, DE HAAS PEW, GOMEZ RI, MARRERO A *et al.* - Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1998, **2**, 743-750.
- DOUGLAS JT, QIAN L, MONTOYA JC, SREEVATSAN S, MUSSER JT *et al.* - Detection of a novel family of tuberculosis isolates in the Philippines. 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, p.572, 1997.
- FRIEDMAN CR, STOECKLE MY, JOHNSON WD Jr & RILEY LW - Double-repetitive-element PCR Method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 1383-1384.
- GOGUET DE LA SALMONIERE YO, LI HM, TORREA G, BUN-SCHOTEN A, VAN EMBDEN JDA & GICQUEL B - Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 2210-2214.
- GOYAL M, SAUNDERS NA, VAN EMBDEN JDA, YOUNG DB & SHAW RJ - Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.*, 1997, **35**, 647-651.
- GUTIERREZ MC, VINCENT V, AUBERT D, BIZET J, GAILLOT O *et al.* - Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 486-492.
- JASMER RM, PONCE DE LEON A, HOPEWELL PC, ALARCON RG, MOSS AR *et al.* - Tuberculosis in Mexican-born persons in San Francisco: reactivation, acquired infection and transmission. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1997, **1**, 536-541.
- KAMERBEEK J, SCHOOLS L, VAN AGTERFELD M, VAN SOOLINGEN D, KUIJPER S *et al.* - Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 907-914.
- PASQUET-ELIA S - La transmission de la tuberculose en Gironde. Investigation épidémiologique et analyse génomique du *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse N° 3059 pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine-Université Bordeaux 2, soutenue le 21 octobre, 1998, pp. 1-96.
- POULET S & COLE ST - Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol*, 1995, **163**, 87-95.
- QIAN L, VAN EMBDEN JDA, VAN DER ZANDEN AGM, WELTEVREDEN EF, DUANMU H & DOUGLAS JT - Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**, 471-474.
- RASTOGI N, SCHLEGEL L, PFAFF F, JEANNE I, MAGNIEN C *et al.* - La tuberculose en région Antilles-Guyane : situation épidémiologique de 1994 à 1996. *BEH*, 1998, **11/98**, 45-47.
- ROUSSEL H, THEODORE M & RASTOGI N - Evolution de la tuberculose en Guadeloupe entre 1982 et 1994. *BEH*, 1996, **2/96**, 5-6.
- SMALL PM, HOPEWELL PC, SINGH SP, PAZ A, PARSONNET J *et al.* - The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N Engl J Med*, 1994, **330**, 1703-1709.
- SOLA C, DEVALLOIS A, HORGEN L, MAISETTI J, FILLIOL I *et al.* - Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg Infect Dis*, 1999, **5**, 404-414.
- SOLA C, HORGEN L, MAISETTI J, DEVALLOIS A, GOH KS & RASTOGI N - Spoligotyping followed by double-repetitive element PCR is a rapid alternative methodology to IS6110-fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 1122-1124.
- SOLA C, LEGRAND E, MAISETTI J, HORGEN L, DEVALLOIS A *et al.* - Epidémiologie moléculaire de la tuberculose dans le département de la Guadeloupe de 1994 à 1996. *BEH*, 1999, **2**, 5-7.
- TEN ASBROEK AH, BORGENDORFF MW, NAGELKERKE NJ, SEBEK MM, DEVILLE W *et al.* - Estimation of serial interval and incubation period of tuberculosis using DNA fingerprinting. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1999, **3**, 414-420.
- TORREA G, OFFREDO C, SIMONET M, GICQUEL B, BERCHE P & PIERRE-AUDIGIER C - Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 1043-1049.
- VAN EMBDEN JDA, CAVE MD, CRAWFORD JT, DALE JW, EISENACH KD *et al.* - Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 406-409.
- VAN SOOLINGEN D, QIAN L, DE HAAS PEW, DOUGLAS JT, TRAORE H *et al.* - Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 3234-3238.