



# JNI

14<sup>es</sup> Journées  
Nationales  
d'Infectiologie

Clermont-Ferrand  
et l'interrégion Rhône-Alpes Auvergne

Du mercredi 12 au  
vendredi 14 juin 2013  
Polydome, centre d'expositions  
et des congrès

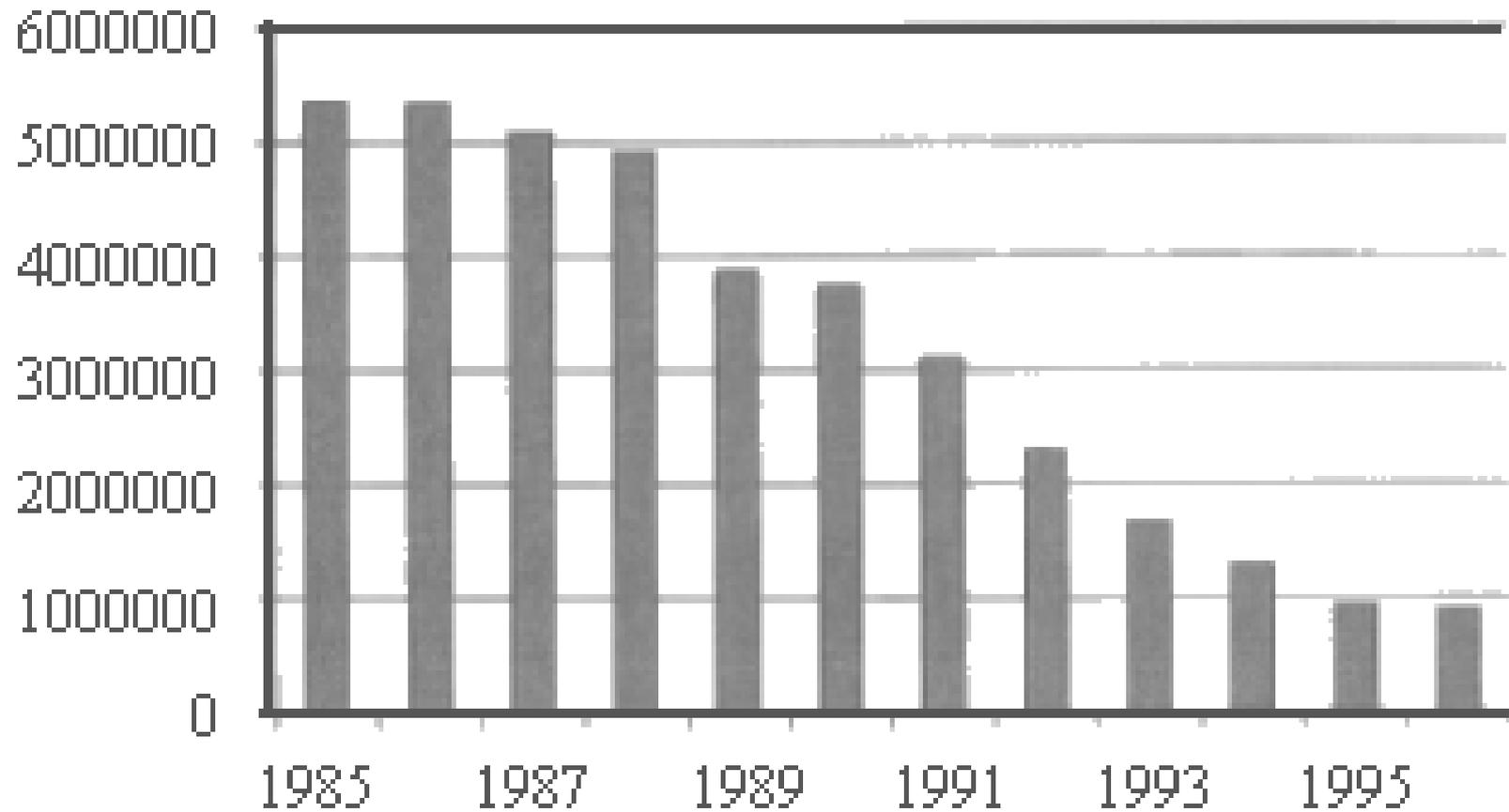


## Lèpre: quoi de neuf dans le diagnostic et la résistance aux antibiotiques?

Emmanuelle CAMBAU  
CNR Mycobactéries (CNRMyRMA)  
Bactériologie, Hôpital Lariboisière APHP,  
Université Paris Diderot, Paris



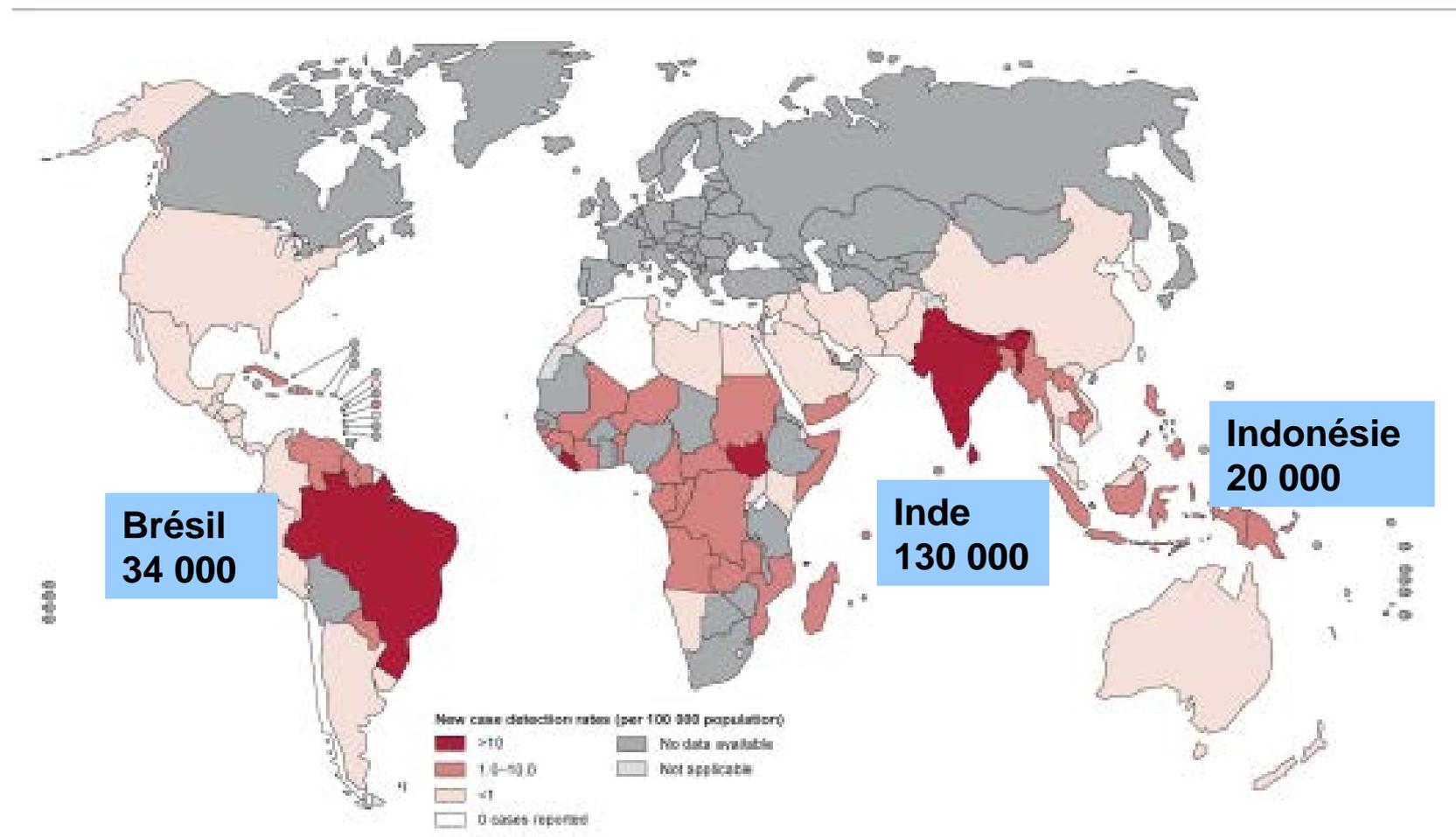
# Prevalence de la lèpre: forte diminution due au traitement



Smith WCS, 1997

# Incidence: 219 000 nouveaux cas en 2011

Leprosy new case detection rates, data reported to WHO as of January 2012



# Diagnostic de la lèpre

- **Diagnostic clinique**
  - Lésions dermatologiques
  - Lésions nerveuses
  - Pays de naissance et de vie
  - Classification : Tuberculoïde, lépromateuse, borderlines
- **Classification OMS**
  - Paucibacillaire : 1 à 5 lésions cutanées
  - Multibacillaire: > 5 lésions cutanées

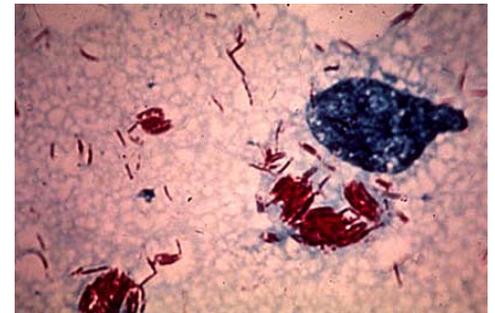
# Formes cliniques



Photos Dalila Mohand Oussaid

# Diagnostic bactériologique de la lèpre

- Examen microscopique de frottis dermiques ou de biopsies cutanées (punch 3 ou 4mm)
  - Bacille acido-alcool-résistant (Ziehl-Neelsen)
  - Index bactériologique (BI) : 1 / 100 champs 'BI1+' à 1000 / champ (BI 6+)
- Lèpre pauci-bacillaire
  - M0 ou 1+ =  $10^6$  bacilles dans le corps
- Lèpre multibacillaire
  - M+ avec BI 2+ à 6+ =  $10^{12}$  bacilles / corps



# Pas d'intérêt de la PCR pour le diagnostic de la lèpre, en particulier les cas paucibacillaires

**Table 1. Efficiencies of in vivo susceptibility testing in the mouse footpad (mouse test) and PCR *rpoB* amplification, according to the number of acid-fast bacilli (AFB) per milliliter in the skin biopsy suspension.**

AFB/mL	No. of biopsies tested	Mouse test		<i>rpoB</i> amplification	
		Positive	Efficiency, % <sup>a</sup>	Positive	Efficiency, % <sup>a</sup>
10 <sup>4</sup> to <10 <sup>5</sup>	3	0	0	1	30
10 <sup>5</sup> to <10 <sup>6</sup>	19	8	42	17	89
10 <sup>6</sup> to <10 <sup>7</sup>	38	20	53	38	100
>10 <sup>7</sup>	23	18	78	23	100
Total	83	46	55	79	95

<sup>a</sup> Efficiency was defined as [(no. of valid tests/no. of tests run) × 100].

# Traitement antibiotique de la lèpre

- Traitement standard depuis 1982 : poly-chimiothérapie (MDT – WHO)
- 6 mois de traitement pour les cas paucibacillaire
  - Rifampicine 600 mg une fois par mois (supervisé)
  - Dapsone 100 mg chaque jour
- 12 mois de traitement pour les cas multibacillaire
  - Rifampicine 600 mg une fois par mois (supervisé)
  - Dapsone 100 mg chaque jour
  - Clofazimine 300 mg une fois par mois (supervisé) + 50 mg chaque jour
- Traitement monodose des cas pauci-bacillaires avec une seule lésion
  - Rifampicine + Ofloxacine + Minocycline

# Résistance aux antibiotiques en lèpre

- **Dapsone**
    - activité clinique découverte 1950
    - premiers traitements de 1960 à 1982 => émergence de souches résistantes à la dapsone en 1964
  - **Début des traitements par la rifampicine en 1968**
    - Résistance à la Rifampicine décrite en 1976
  - **Efficacité de l'ofloxacine démontrée en 1985**
    - première souche résistante à l'ofloxacine en 1997
  - **Environ 200 000 nouveaux cas par an**
    - 1 à 5% de rechutes (2 000 à 10 000 cas)
- => **Combien de cas de résistance ??**

# Mesure de l'activité des antibiotiques

- *M. leprae* ne cultive pas in vitro
  - => les tests de sensibilité aux antibiotiques se font chez la souris (Shepard 1960)
  - 20 à 50 souris par souche testée
- Le temps de doublement de 10-15 jours
  - Durée de l'expérience: 1 an (souris traitées et nourries)



# Pré-requis de l'usage de l'antibiogramme moléculaire

- Connaissance des mécanismes de résistance => définir le genotype des souches résistantes
- Bonne concordance entre genotype (mutation) et phénotype (souris) => le génotype va prédire le phénotype
- Développement de méthodes moléculaires pour détecter les mutations à partir du prélèvement (frottis ou biopsie cutanée)
- Technique applicable dans les pays endémiques

# Résistance à la rifampicine chez *M. leprae* = mutation du gène *rpoB*

432	433	436	Insertion 438	441	451	456	458
Gly	Thr	Leu	Gln	Asp	His	Ser	Leu
Ser	Ile	Pro	Val	Asn Tyr	Asp Tyr	Leu Met Phe Trp	Val

\*Numbering system of *M. leprae* genome strain TN  
 Position 456 in *M. leprae* = 531 in *E. coli*  
 Position 456 = previous position 425 in *M. leprae*

Honore 1993, Maeda 1999, Maeda 2001, Cole 2001, Cambau 2002, Zhang 2004, Cambau 2012

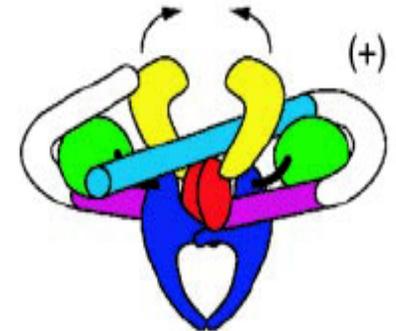
# Résistance à la dapsonsone chez *M. leprae*

- **Dapsonsone = Diamino-diphenyl-sulfone (DDS)**
  - Dérivé des sulfamides
  - Inhibiteur de la dihydropteroate synthase (DHPS)
- **Mécanisme de résistance**
  - Mutations dans le gène *folP1* codant la DHPS
  - positions 53\* and 55\*
  - Thr53 => Ile, Arg or Ala
  - Pro55 => Arg, Leu

\*Numérotation de *M. leprae*, 62 and 64 chez *E. coli*

# Résistance à l'ofloxacine chez *M. leprae*

- Mutation dans le gène *gyrA* codant la sous- unité A de l'ADN gyrase, seule topoisomérase de type II chez *M. leprae*
- Mutation Ala 91 Val le plus fréquemment
- Mutation Gly 89 Cys décrite
- Rares souches pour l'instant



Cambau 1997, Matsuoka 2007, Matrat 2008

Emmanuelle CAMBAU

# Concordance of genotype (*rpoB* mutations) and phenotype (mouse footpad susceptibility testing) for dapson resistance

Level of résistance	N	Mutation <i>folP1</i> at 53 or 55	
		Yes	No
R-100	21	20	1
R-10	9	4	5
R-1	8	2	6
Total strains DDS-R	37	26	11
Strains DDS S	72	0	72

**Overall sensitivity = 70 % (26/37 ) and Specificity = 100% (22/22)**

**Sensitivity for clinical resistance (R-10 or R-100) = 80% (9/10)**

**Sensitivity for clinical resistance in relapse cases = 100% (11/11)**

Kai 1999, Matsuoka 2007, Williams 2000, 2001, Maeda2001, Cambau 2006

Emmanuelle CAMBAU

# Concordance of genotype (*rpoB* mutations) and phenotype (mouse footpad susceptibility testing) for rifampin resistance

genotype result	Susceptibility result		
	Rif-R	Rif-S	No growth
<i>rpoB</i> mutation	23	1*	1
WT	1**	46	51

\*Ser522Cys, 0 /5 mice

\*\*2/7 mice

**Concordance = 69/71 = 97%**

Updated Cambau CID 2002 , Honore 1993

Emmanuelle CAMBAU

# Technologie DNA STRIP (Hain Lifescience)

1. bandelette préparée avec sondes spécifiques

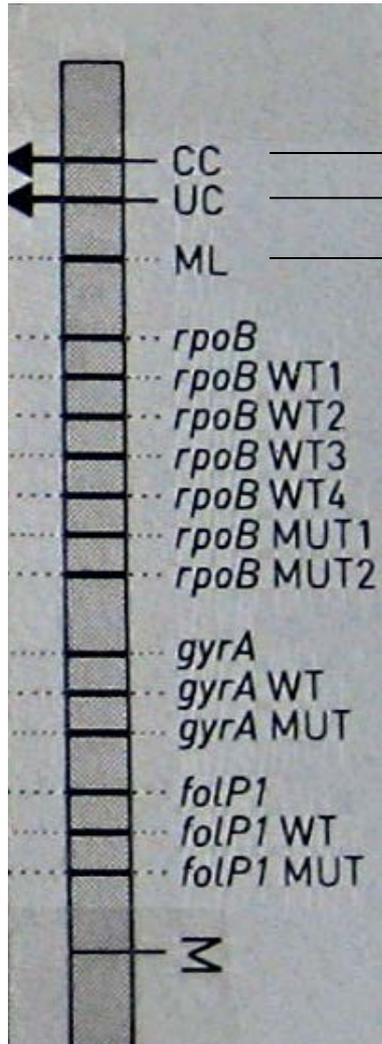
2. PCR multiplexe  
=> amplification de  
fragments d'ADN

3. Hybridation  
ADN-ADN

**signal positif**  
= hybridation entre ADN  
amplifié et sonde  
=> sequence  
Identique à la sonde

**signal négatif**  
= pas hybridation entre ADN  
amplifié et sonde  
=> sequence  
différente de la sonde

# Prototype du test GenoType LepraeDR



← CC → Témoign de révélation

← UC → Témoign d'amplification et hybridation

← ML → Identification de *M. leprae*

**Résistance à la Rifampicine MUT1**

: Ser531Leu

MUT2 : His526Tyr

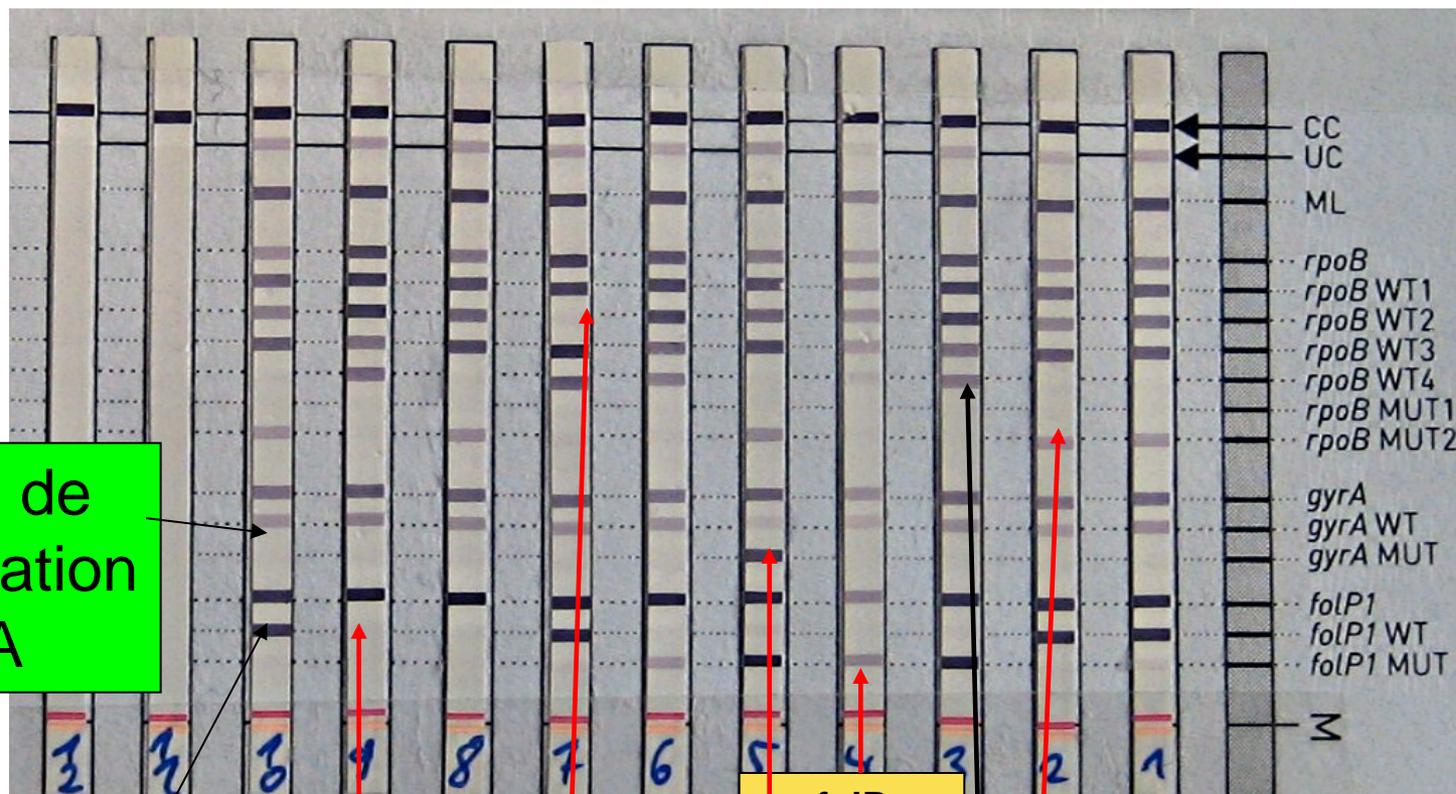
**Résistance à l'ofloxacine (fluoroquinolones)**

gyrA MUT : Ala91Val

**Résistance à la dapsonne**

folP1 MUT : Pro55Leu

# Exemples de résultats du test GenoType Leprae DR



Pas de mutation *gyrA*

folP mutation

Mutation *rpoB*

Mutation *gyrA*

folP mutation

Mutation *rpoB*

Pas de mutation folP

Pas de mutation *rpoB*

# Détection de la résistance dans la lèpre - Stratégie du Réseau OMS

clinics

Cas de rechute de lèpre



prélèvement

laboratory

**Treatment des cas MDR\***  
-si RmpR => oflo + mino+ clo

**Traitement Standard**  
Rmp+Dds+clo

**antibiogramme moléculaire**  
(ex. GenoType LepraeDR )

négatif

Vérifier si rechute?

Mutation => R

Pas de mutation  
=> S

Rapport OMS

Resultats  
clinicien

Banque de  
données



\*see text

14<sup>es</sup> JNI, Clermont-Ferrand  
du 12 au 14 juin 2013

# Surveillance de la résistance aux antilépreux

- **Surveillance à partir des données du CNR**
  - Antibiogramme depuis 1988
  - Antibiogramme moléculaire depuis 2000
- **Réseau de surveillance de l'OMS**
  - Depuis 2008
  - De 3 pays (2008) à 15 pays (2012) participent

# Surveillance de la résistance à la rifampicine en France (données CNR 1989-2009)

- **199 cas**
  - 102 nouveaux cas
  - 74 rechutes
  - 23 suivi (patients BI+ after treatment)
- **13 cas de résistance à la rifampicine**
  - 13 rechutes
  - 11 DOM-TOM, 1 Mali, 1 Cameroun

# Histoire des cas de lèpre français résistants à la rifampicine

**Table 3. Characteristics of the 11 patients with rifampin-resistant (assessed by in vivo test in the mouse) leprosy.**

Patient no.	Year of biopsy	Age in years	Country	Case	Year of first diagnosis	Previous treatment and duration	Susceptibility to other drugs
1	1989	41	FWI	Relapse	1956	Dds 1956–1960; Sif + Rif 1980–1982	Dds <sup>R</sup> , Pth <sup>S</sup>
2	1990	58	FWI	Relapse	1959	Dds 1959–1968; Sif 1968–1980; Sif + Dds + Rif + Clf 1980–1987	Dds <sup>R</sup>
3	1991	45	FWI	Relapse	1961	Dds 1961–1974; Dds + Rif 1974–1975	Dds <sup>R</sup> , Pth <sup>S</sup>
4	1992	55	FWI	Relapse	1956	Dds 1956–1973; Rif 1973–1974; Dds + Sif 1975–1991	Dds <sup>R</sup> , Pth <sup>S</sup>
5	1992	35	Mali	Relapse	1979	Dds 1979–1991; Rif + Ofx 1 month 1992	Dds <sup>R</sup> , Pth <sup>R</sup> , Ofx <sup>R</sup>
6	1992	50	FWI	Relapse	1958	Dds 1958–1977; Rif 1977–1979; Rif + Pth	Dds <sup>R</sup> , Pth <sup>R</sup>
7	1993	57	Cameroon	Relapse	1960	Dds 1961–1975; Pth + Rif 1975–1992	Dds <sup>S</sup> , Pth <sup>S</sup>
8	1995	64	FWI	Relapse	1946	Dds 1946–1978; Sif 1979–1982; Rif 1983–1995	Dds <sup>S</sup> , Pth <sup>S</sup>
9	1995	30	FWI	Relapse	1980	Dds + Rif + Pth 30 months	Dds <sup>S</sup> , Pth <sup>S</sup>
10	1997	45	FWI	Relapse	1950	Dds for 11 years	Dds <sup>S</sup> , Pth <sup>S</sup>
11	1999	69	FWI	Relapse	1947	Dds 1947–1972; Dds + Rif 1973–1976	Dds <sup>R</sup>

**NOTE.** Clf, clofazimine; Dds, dapson; FWI, French West Indies; Ofx, ofloxacin; Pth, prothionamide; R, resistant; Rif, rifampin; S, sensitive; Sif, sulfonamides.

2001: Martinique, relapse, dds, dds+Rmp, DdsS

2002: Martinique, relapse, dds, Rmp, DdsS

# Surveillance de la résistance – CNR MyRMA France

Tableau 19 : récapitulatif 2006-2011 des prélèvements reçus au CNR-MyRMA pour diagnostic de lèpre

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>N total reçus</b>	10	10	18	17	25	51	51
<b>N prélèvements positifs pour <i>M. leprae</i> :</b>	5	2	7	6	7	22	24
Nouveau cas	4	0	5	5	6	9	20
Rechutes	1	2	2	1	1	13	4
<b>Lieu du diagnostic :</b>							
France Métropolitaine	0	0	2	2	4	10	8
DOM-TOM	5	2	5	4	3	12	16
<b>Pays d'origine des patients :</b>							
DOM-TOM	5	2	5	2	5	14	16
Afrique			1	2	1	8	4
Asie-Océan Indien			1		1		3
Amérique							1
Europe				2			
<b>Resistance aux antilépreux :</b>							
Dapsone	1/4	0/2	1/4	1/6	1/7	1/19	1/19
Rifampicine	0/5	0/2	0/4	0/6	0/7	1/19	0/19
Ofloxacine	0/3	0/2	0/3	1/6	0/7	0/19	0/19

rapport CNR MyRMA 2013 <http://cnrmyctb.free.fr>

# Surveillance de la résistance secondaire dans la lèpre dans le monde

Tableau 6 Nombre de cas de rechute de lèpre dans le monde, 2004-2011

Year – Année	No. of countries reporting – Nombre de pays notifiant des cas de rechute de lèpre	No. of relapses – Nombre de cas de rechute de lèpre
2004	40	2439
2005	44	2783
2006	41	2270
2007	43	2466
2008	49	2985
2009	122	3120
2010	117	2113
2011	96	2921

OMS 2012

# Résultats provisoires de la résistance secondaire OMS

	2008	2009	2010	Total
N pays	3	6	8	8
N rechutes	69	887	109	1055
N étudiées	59	213	88	360 (30%)
N résultats	35	110	72	217
R DDS	8	12	9	29
R RMP	6	9	1	16
R FQs	0	2	0	2

- 15% de résistance secondaire à la dapsonsone
- 7% de résistance secondaire à la rifampicine
- 1% de résistance aux fluoroquinolones

# Conclusion

- La lèpre se maintient bien dans plusieurs pays
- Le diagnostic est surtout clinique!
- Il faut pouvoir détecter la résistance aux antilépreux
  - Résistance secondaire chez les rechutes pour avoir un traitement adéquat
  - Résistance primaire pour la surveillance mondiale
- Cela est possible grâce aux tests moléculaires
  - Ces tests doivent être accessibles aux pays endémiques où être faits en collaboration Nord-Sud, Est-Ouest
- La surconsommation des antibiotiques (rifampicine, fluoroquinolones, macrolides) peut être responsable de résistance primaire inhabituelle