

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie en Secteur Biomédical et Vétérinaire



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER
Thème

Etude comparative entre la culture classique et automatisée dans le diagnostic et la résistance aux antituberculeux de *Mycobacterium tuberculosis* à l'Institut Pasteur d'Alger

Présenté par :

KASSA Sabrina et MESSAOUDI Massilva

Soutenu le : **24 Juin 2017 à 13H00**

Devant le jury composé de :

M^r BOUKHALFA F	MAA	President
M^{elle} YANAT B	MCB	Examinatrice
M^r DJOUDI F	MCA	Encadreur
M^{elle} TOUATI R	MCA	Co-encadreur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Après Avoir Rendu Grâce A Dieu Le Tout Puissant Et Le Miséricordieux Nous Tenons A Remercier Vivement Tous Ceux Qui, De Près Ou De Loin Ont Participé A La Réalisation De Cette Etude. Il S'agit Plus Particulièrement De :

D^r DJOUDI Ferhat, Notre Promoteur Pour Son Aide, Sa Disponibilité, Ses Conseils Et Orientations Qui Nous Ont Permis De Mener A Bien Ce Travail.

Nous tenons à remercier vivement les membres du jury : **M^r BOUKHALFA Farid** qui nous a fait l'honneur de présider le jury et **M^{elle} YANAT Betitra** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos Remerciements Sincères Vont A L'institut Pasteur D'ALGER, A Tous Les Employés Qui Y Travaillent, De Nous Avoir Permis D'effectuer Notre Projet De Fin De Cycle, Et De Nous Avoir Confié Des Responsabilités Qui Nous ont Permis De Réalisé Notre Pratique, A Leurs Tête :

P^r YALA Djamel, Chef De Service De L'unité Tuberculose De Nous Avoir Accordé Ce Stage, Ainsi Que L'intérêt Qu'il A Manifesté Tout Au Long De La Réalisation De Ce Travail.

D^r TOUATI Rym, Notre Co-Promotrice De Nous Avoir Encadré Tous Au Long De Notre Période De Stage, De Nous Avoir Orienté Et Consacrer Son Précieux Temps A Jugé Notre Travail.

Sans Pour Autant Oublié Toute L'équipe Du Service Tuberculose, En Particuliers : **YAHI Renda**, **MEZIDI Nadir**, **DIDOUN Amine**, **LALIOUI Zohir**, **BOUSSAYOUD Nawel**.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail, que j'ai pu réaliser avec l'aide du tout puissant

À ma très chère maman et mon très cher papa, pour leurs soutiens que j'ai toujours ressenti, leurs encouragements qui m'ont poussé à aller de l'avant, leurs confiances, les sacrifices et tous les efforts consentis pour mon éducation et ma formation, mais surtout leurs patience, je vous dois la vie. Que dieu vous préserve une longue et heureuse vie.

À la mémoire des personnes qui compte énormément pour moi, que dieu vous accueille dans son vaste paradis

À mon petit frère Samy et ma petite Kenza, je vous souhaite beaucoup de bonheur et réussite dans votre vie.

À toute ma Famille : Oncles, Tantes, Cousins et Cousines, plus spécialement Ma famille d'Alger Tata Hnia, tonton Hassen, sans qui je n'aurai jamais pu accomplir mon stage, Mes cousines Sara, Lynda, Célia et ma petite princesse Ania, qui m'ont beaucoup soutenu, encourager et surtout accueilli chez eux. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle.

À Said, tu as toujours été là pour moi, ton soutien, ton aide et surtout tes encouragements ont fait de moi une personne plus forte. Que dieu te protège et te procure joie et bonheur.

À tous mes amis (es) d'ici et d'ailleurs.

À tous les membres de l'association Lahna Smile, vous êtes et vous serez ma seconde famille, je vous adore.

À ma binôme Massilva, et toute sa famille.

SABRINA

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

A Mes très chers parents

A qui je dois ce que je suis

Je leur explique ma profonde gratitude pour

Les sacrifices consentis pour mon éducation et mes études

La bienveillance avec laquelle ils m'ont toujours entouré

Et leur soutien qui n'ont jamais cessé de m'approvisionner.

*A Mon grand frère Amar et ma cher petite sœur Zahoua à qui je souhaite
une vie plein de bonheur, santé et réussite.*

*A Mon fiancé Nassim à qui je dois une grande part de ma réussite, grâce à son soutien et
à sa compréhension et à qui je souhaite tous le bonheur du monde.*

*A Ma belle-famille : Yama Khelidja, Dada Lyazid, Khelaf, Louisa, Hani, Kahina Et son
mari, les petits Racim, Samy, Aamar, Lyliia.*

A Mes oncles, tantes, cousins, cousines, en particulier :

*Nana Ldjouhar et ses enfants chaqu'un son nom et ma tante Zoulikha, merci De M'avoir
Accueillir Pendant Toute La Période De Mon Stage merci aussi pour votre soutien et
encouragement.*

Ainsi que mon oncle Boubekar Et sa femme Lila et ses enfants : Wassim et Islem.

Et à toute la famille MESSAOUDI.

*A Mes chers Copines Nawel et Kattia avec qui j'ai partagé des moments précieux et je
leur souhaite la réussite et le bonheur, ainsi que leur famille.*

A Mes Amies

Serina, Madiha, Naima, Tatou, Sarah, Nawel, Meriem, Nadjet, siham, thiziri

A Ma Binôme Sabrina Et Sa Famille

Et Toute La Promotion MSBV 2016/2017

A Qui Je Souhaite La Réussite Dans Leur Vie Professionnelle

MASSILVA

Tables des Matières

TABLES DES MATIERES	I
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	V
INTRODUCTION	1
PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE	3
AGENT PATHOGENE	3
<i>Historique.....</i>	3
I. <i>Caractères fondamentaux des mycobactéries.....</i>	3
II. <i>Epidémiologie.....</i>	4
1. Dans le monde	5
2. En Algérie.....	5
III. <i>Physiopathologie et Aspect clinique</i>	5
IV. <i>L'Antibiothérapie Antituberculeuse</i>	6
DIAGNOSTIC DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	8
I. <i>Bacilloscopie.....</i>	8
II. <i>Culture classique et automatisée.....</i>	8
III. <i>Antibiogramme classique et automatisé.....</i>	9
IV. <i>Techniques moléculaires</i>	10
V. <i>Utilisation des marqueurs biologiques</i>	11
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	12
I. <i>Cadre de l'étude et objectifs du travail.....</i>	12
II. <i>Prélèvements.....</i>	12
III. <i>Bacilloscopie</i>	13
III.1. <i>Confection du frottis:.....</i>	13
III.2. <i>Coloration de Ziehl-Neelsen :</i>	13
IV. <i>Culture.....</i>	14
IV.1. <i>Méthode classique:.....</i>	14
IV.2. <i>Méthode automatisée (BACTEC MGIT 960) :</i>	15
V. <i>Antibiogramme.....</i>	17
V.1. <i>Antibiogramme sur milieu Solide.....</i>	17
V.2. <i>Antibiogramme sur milieu liquide (MGIT)</i>	18

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	20
<i>I. Diagnostic des infections par M. tuberculosis.....</i>	<i>20</i>
<i>Discussion :.....</i>	<i>22</i>
<i>II. Résistance des souches de M. tuberculosis aux antituberculeux.....</i>	<i>26</i>
II.1 .Résultats de chaque antibiotique.....	27
II.2. Les profils de résistances	30
<i>Discussion :.....</i>	<i>31</i>
CONCLUSION.....	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	VII
ANNEXES	XVIII

Liste des Tableaux

Tableau I : Les antibiotiques de première ligne, leurs cibles cellulaires et les mécanismes de résistance chez les mycobactéries.....	6
Tableau II : Les antibiotiques de seconde ligne, leurs cibles cellulaires et les mécanismes de résistance chez les mycobactéries.....	7
Tableau III : Expression des résultats d'une bacilloscopie.....	14
Tableau IV : Identification des mycobactéries sur milieux spécifiques	17
Tableau V: Isolement de <i>M. tuberculosis</i> sur le <i>MGIT</i> et sur L-J.....	21
Tableau VI : Discordances observées entre le <i>MGIT</i> et le L-J	22
Tableau VII: Temps moyen de détection de <i>M. tuberculosis</i>	22
Tableau VIII: Comparaison de la sensibilité de <i>M. tuberculosis</i> aux 4 antituberculeux de première ligne, testée par deux méthodes différentes.....	26
Tableau IX : Concordances et discordances sur les deux milieux.....	26
Tableau X : analyse de la sensibilité sur les deux milieux.....	27
Tableau XI: analyse de la sensibilité de la SM sur les deux milieux.....	27
Tableau XII: comparaison de la sensibilité entre le <i>MGIT</i> et le L-J pour la SM.....	28
Tableau XIII: analyse de la sensibilité de la INH sur les deux milieux.	28
Tableau XIV: comparaison de la sensibilité entre le <i>MGIT</i> et le L-J pour la INH.	28
Tableau XV: Analyse de la sensibilité de la RIF sur les deux milieux	29
Tableau XVI: comparaison de la sensibilité entre le <i>MGIT</i> et le L-J pour la RIF.....	29
Tableau XVII : analyse de la sensibilité EMB sur les deux milieux.	30
Tableau XVIII: comparaison de la sensibilité entre le <i>MGIT</i> et le L-J pour EMB	30
Tableau XIX: Profils des souches résistantes (MDR).....	30

Liste des Figures

Figure 1 : Structure de la paroi des mycobactéries.....	4
Figure 2 : Lecture en créneau d'une bacilloscopie.	13
Figure 3 : Tests d'identifications de <i>M. tuberculosis</i> à partir d'une primo-culture du tube MGIT.	20

Liste des Abréviations

- A.A.R** : acido alcolo resistance.
- ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique.
- Alr** : D-alanine racemase.
- ARN** : Acide ribonucléique.
- ATB** : Antibiotique.
- B** : Bacilloscopie
- BAAR** : Bacille Acido Alcolo Resistant.
- BCG** : Bacille de Calmette et Guérin.
- BK** : Bacille de Koch.
- CDC** : Centers for Disease Control and Prevention.
- CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice
- Ddl** : D-alanine D-alanine ligase.
- DT** : Déjà traité.
- EMB** : Ethambutol.
- INH** : Isoniazid.
- IPA** : Institut Pasteur d'Alger.
- KM** : Kanamycine.
- L-J** : Löwenstein-Jensen.
- MDR –TB** : Multi Drug Resistant Tuberculosis.
- MGIT** : Mycobacterial growth indicator tube.
- MTb** : *Mycobacterium tuberculosis*.
- NALC** : N-acétyl-L-cystéine
- NT** : Non traité.
- OADC** : Oleic-acid Albumine Dextrose Catalase.

OFX : Ofloxacin.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PANTA : Polymyxin B Amphotericin B Nalidixic acide Trimethoprim Azlocillin.

PAS : Acide Para-amino Salicylique.

PCR : Polymérase Chain Réaction.

pH : potentiel hydrogène.

PNB : P-nitro benzoïque.

POA : Acide pyrazinoïque.

PZA : Pyrazinamide.

RIF : Rifampicine.

SCTMR : Service de contrôle de la tuberculose et des maladies respiratoires

SIRE : Streptomycine Isoniazide Rifampicine Ethambutol.

SM : Streptomycine.

TB : Tuberculose.

TC : témoin de croissance.

TCH : Hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique.

UV : Ultra-violet.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

XDR-TB : Extensively Drug Resistant Tuberculosis.

ZN : Ziehl Neelsen.

INTRODUCTION

Introduction

La tuberculose est une maladie infectieuse très ancienne. L'agent étiologique de cette pathologie, *Mycobacterium tuberculosis* a été découvert en XIX^{ème} siècle par Robert Koch. Le bacille tuberculeux aurait infecté les premiers hominidés et Co-évolué avec eux (**Gutierrez et al., 2005, Wirth et al., 2008**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près d'un tiers de la population mondiale est contaminée par le bacille tuberculeux. L'incidence de cette maladie a baissé en moyenne de 1,5% par an depuis 2000. En 2015, 87% des nouveaux cas se sont produits dans les 30 pays à forte charge de la tuberculose. Six pays ont totalisé 60% des nouveaux cas: Inde, Indonésie, Chine, Nigéria, Pakistan et Afrique du Sud (**OMS, 2015**).

L'évolution du diagnostic et du traitement de la tuberculose ont permis de sauver 49 millions de vies entre 2000 et 2015 (**OMS, 2015**).

C'est une maladie principalement pulmonaire qui débute généralement par l'inhalation de gouttelettes contaminées par *M. tuberculosis*, émises dans l'air par un individu malade, en toussant ou en parlant. En effet, les gouttelettes contaminées peuvent rester dans l'air pendant plusieurs heures et la dose infectieuse minimale peut être très faible de 1 à 10 bacilles (**Russell et al., 2009**).

Le contrôle de la maladie commença grâce à l'identification de *M. tuberculosis*, et au développement d'outils de détection, les rayons X et le test à la tuberculine. Au XX^{ème} siècle, les progrès dans la lutte contre la tuberculose continuèrent avec la mise en place, par Albert Calmette et Camille Guérin, du vaccin BCG (pour Bacille Calmette et Guérin) et avec l'apparition des antibiotiques à partir des années 1940 (**Kochi, 1994 ; Leão and Portaels, 2007**).

Le diagnostic de la tuberculose est toujours heurté aux processus long et fastidieux des techniques de mises en évidence des mycobactéries. L'examen microscopique direct bien que facile à réaliser, manque de sensibilité, la culture qui reste de référence et de bonne sensibilité, demande parfois jusqu'à dix semaines. Pour pallier à la lenteur de cultures sur milieux solides, et au manque de sensibilité de l'examen direct, de nouvelles méthodes ont été mises au point, basées sur l'utilisation d'un milieu liquide permettant une

mise en route plus précoce et plus adapté à l'antibiothérapie (**Kanai, 1990 ; Lévy-Frébault, 1992**).

Le développement de nouvelles techniques automatisées basées sur l'utilisation des milieux liquides, qui confère un gain de temps remarquable, en plus de leurs sensibilités et spécificités bien déterminé, parmi eux : *BACTEC MGIT 960*, *Versa TREK*, *BACTEC 460* ...etc.

Pour cela nous avons entamé une étude comparative entre la culture classique sur Löwenstein-Jensen et la culture automatisée sur *BACTEC MGIT 960* afin de répondre aux questions suivantes :

- ❖ Y a-t-il une différence en termes de sensibilité et de spécificité entre les résultats de la culture obtenue sur milieu Löwenstein-Jensen et sur le *BACTEC MGIT 960* ?
- ❖ Peut-on avoir des résultats différents concernant la sensibilité / résistance aux antituberculeux de 1^{er} ligne ?

Afin de répondre aux questions posées nous avons adopté les démarches suivantes :

- ✓ Evaluation du taux et du temps de détection de *Mycobacterium tuberculosis* avec le *BACTEC MGIT 960* en comparaison avec la culture sur milieu Löwenstein-Jensen.
- ✓ Evaluation du taux et du temps de détection de la sensibilité aux antituberculeux de 1^{er} ligne de *M. tuberculosis* avec le *BACTEC MGIT 960* en comparaison avec la culture classique.

BIBLIOGRAPHIE

PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE

AGENT PATHOGENE

Historique

La tuberculose humaine (TB) est une maladie connue depuis l'antiquité (**Cosivi et al., 1995**), mais ce n'est qu'en 1882 que Robert Koch a pu colorer et faire pousser sur un sérum coagulé le bacille responsable de cette infection (**Koch, 1882**). Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, de la famille des *Mycobacteriaceae*, de l'ordre des *Actinomycetales* et de la classe des Actinobacteries (**Shinnick et al., 1994**). Toutes les mycobactéries, capables de causer la tuberculose sont regroupées sous la dénomination de mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

La mise en évidence du *Complexe tuberculosis* et le diagnostic de la tuberculose sont affirmés par la culture sur des milieux spécifiques, mais nécessitent plusieurs semaines d'attente, vue le temps de génération très élevé de cette bactérie. Cependant, depuis une dizaine d'années, on assiste à l'émergence de techniques qui raccourcissent de manière tangible le temps nécessaire au diagnostic bactériologique (**Bendadda, 2003**).

I. Caractères fondamentaux des mycobactéries

La composition particulière de leur paroi confère un caractère tinctorial spécifique aux mycobactéries, dit Acido-Alcool-Résistance (A.A.R). Ce caractère est utilisé en microscopie dans la coloration de Ziehl-Neelsen afin de poser le diagnostic positif de la tuberculose. Ces bacilles présentent une résistance relative aux détergents et aux désinfectants chimiques (acide sulfurique, soude) par rapport aux germes banals, ce caractère est utilisé pour décontaminer les prélèvements avant leur mise en culture (**Yala et Tazir, 2009**). Après coloration, ces bactéries apparaissent au microscope optique comme des bâtonnets rouges, isolées ou en petits amas (**Harshey et al., 1977**).

Les mycobactéries sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 1 ~ 10 µm de long et de 0,2 ~ 0,6 µm de large, avec des extrémités arrondies, immobiles, non capsulés et asporulés. Ce sont des germes aérobies stricts, se cultivent entre 30° et 40° C avec une température optimale de 35° et 37°C. Ils sont également caractérisés par une croissance très lente (multiplication toutes les 20 heures en moyenne). Le BK est un germe exigeant,

nécessitant des milieux enrichis. Le plus utilisé est le milieu solide : Löwenstein-Jensen, sur lequel l'apparition des colonies débute 3 à 4 semaines après ensemencement. Sur ce dernier, les colonies sont opaques, de couleur crème et d'aspect en chou-fleur.

Les mycobactéries sont très sensibles à la chaleur, à la lumière solaire, au rayon X et aux UV. Elles résistent cependant au froid et à la dessiccation. Elles sont plus résistantes que les bactéries usuelles aux désinfectants hydrosolubles, ainsi qu'aux enzymes phagocytaires (Diande, 2010).

Ces caractéristiques biochimiques et enzymatiques sont à la base de l'identification de *M. tuberculosis* au sein du genre. Les plus utilisées sont la production d'acide nicotinique ou niacine, présence de nitrate réductase, de catalase et d'uréase, résistance à l'hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique ou TCH, et sensibilité au pyrazinamide (Grosset et al., 1990 ; Romain et al., 1996).

Chez les Mycobactéries, l'épaisseur de la paroi est unique en son genre, et représente jusqu'à 60% de la matière sèche de la bactérie. Elle est composée de 4 couches, dont la première est constituée de peptidoglycane. Les 3 autres couches sont composées de lipides à base d'acide mycolique et de glycolipides sous différentes formes (Figure 1). Cette richesse en acides gras confère une texture cireuse à la bactérie (Jawetz et al., 1968).

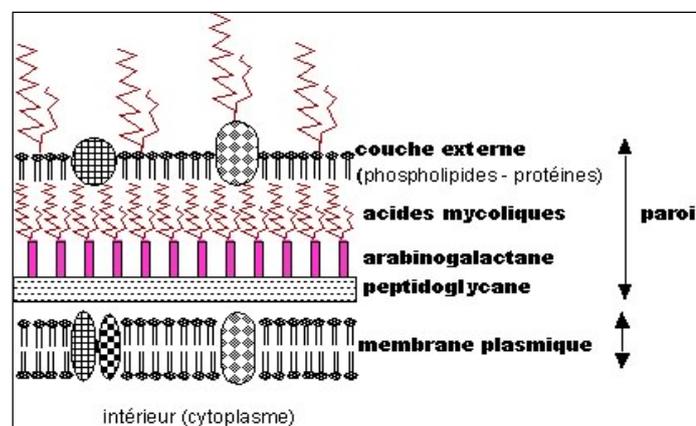


Figure 1 : Structure de la paroi des mycobactéries.

II. Epidémiologie

Plusieurs facteurs de risques sont associés à la transmission et au développement des infections au BK, qui sont encore et toujours liés au contexte socio-économique des populations atteintes. En effet, cette pathologie est associée à la pauvreté et à la surpopulation, car elle se développe dans un contexte de proximité, de manque d'accès aux soins et de malnutrition (Wampande et al., 2015 ; Cegielski et McMurray, 2004).

Chaque année, l'OMS publie un rapport sur l'épidémiologie générale de la tuberculose à l'échelle internationale.

1. Dans le monde

La tuberculose est l'une des 10 premières causes de mortalité dans le monde (OMS, 2016). En 2015, 9,6 millions de personnes ont contracté cette maladie et 1,5 million en sont mortes (dont 0,4 million ayant le VIH) plus de 95% des décès surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. La tuberculose est observée dans toutes les régions du monde. En 2015, le plus grand nombre de cas a été enregistré en Asie, avec 61% de nouveaux cas, suivi par l'Afrique avec 26% des cas (OMS, 2016).

2. En Algérie

L'Algérie, jadis pays à haute prévalence de tuberculose, a rejoint depuis le début des années 1980 le groupe des pays à prévalence modérée, ou l'incidence annuelle de la tuberculose toutes formes se situe entre 20 à 99 cas pour 100 .000 habitants (PNLCT, 2011). En 2015, le nombre de cas déclaré a atteint les 23 379 cas. Parmi les nouveaux cas, on observe une prédominance de tuberculose extra pulmonaire avec 15174 cas (64,9%) et 8197 cas (35,1%) pour la tuberculose pulmonaire (OMS, 2016).

III. Physiopathologie et Aspect clinique

Emis par une source d'infection, le plus souvent un tuberculeux pulmonaire, dans les gouttelettes de FLUGGE, *M. tuberculosis* est inhalé et atteint l'alvéole pulmonaire après avoir traversé le tractus respiratoire (Kaufmann, 2011), celle-ci représente la voie de transmission principale de la tuberculose (Eddie-Wampande et al., 2015). La maladie résulte de la multiplication du bacille et de ses interactions avec l'hôte (immunité à médiation cellulaire, activation des lymphocytes T et des macrophages). *M. tuberculosis* ne produit pas de toxine (Kaufmann 2001).

Bien que la tuberculose puisse se manifester à L'emplacement de tissu infecté, le poumon représente la porte d'entrée principal de *M. tuberculosis*, mais cela n'empêche pas l'apparition de nombreux cas de tuberculose extra-pulmonaire (Kaufmann 2001).

✓ **Tuberculose pulmonaire:** Les circonstances de diagnostiques habituelles de la tuberculose pulmonaire peuvent être un examen radiologique systématique, des signes généraux comme les fièvres, frissons, sueurs, et d'altération de l'état général. Des signes fonctionnels sous forme de toux persistante avec ou sans expectoration, hémoptysie répétée, ou dyspnée, en fonction de l'étendue de l'atteinte parenchymateuse par la maladie.

La tuberculose pulmonaire peut s'associer à un épanchement pleural ou à d'autres localisations (**Rist, 1949**).

✓ **Tuberculose extra-pulmonaire:** elle est souvent asymptomatique sur le plan général. La certitude diagnostique de ces localisations est souvent difficile à confirmer. Elle repose sur des arguments cliniques, biologiques, radiologiques, histologiques et parfois bactériologiques. Les manifestations extra pulmonaires les plus connues sont les lymphadénites tuberculeuses, la tuberculose pleurale, uro-génitale, osseuse, méningée et miliaire (**Sharma et al., 2005**).

IV. L'Antibiothérapie Antituberculeuse

L'antibiothérapie est mise en œuvre pour traiter les patients tuberculeux, alors que le traitement préventif repose sur la vaccination au BCG (Bacille de Calmette et Guérin).

Le traitement curatif a une durée de six mois minimum, avec une prise quotidienne de quatre antibiotiques de première ligne pendant deux mois : isoniazide, rifampicine, pyrazinamide, ethambutol, puis d'isoniazide et de rifampicine pendant quatre mois. En cas d'infection par une souche résistante à un ou plusieurs des antibiotiques de première ligne, des antibiotiques dits « de seconde ligne » sont administrés aux patients pour une période de 8 mois en associant : Streptomycine, isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et ethambutol (**Ginsberg et Spigelman, 2007**). Un autre régime dit de «Troisième ligne» est destiné aux malades atteints par une souche multi résistante à l'isoniazide et à la rifampicine, au minimum. Ce régime est basé sur l'éthionamide, ofloxacine, kanamycine, cyclocérine, associés au pyrazinamide pendant 2 ans (Tableau I et II) (**PNLCT, 2011**).

Tableau I : Les antibiotiques de première ligne, leurs cibles cellulaires et les mécanismes de résistance chez les mycobactéries.

Antibiotiques	Cibles cellulaires et Conséquences	Gènes impliqués dans la résistance
Isoniazide (INH) ⁽¹⁾	Enoyl réductase Inhibition de la synthèse des acides mycoliques	InhA <i>katG</i> (catalase peroxydase) <i>inhA</i> (énoylréductase)
Rifampicine (RIF) ⁽²⁾	Sous unité β de l'ARN polymérase Inhibition de la synthèse de l'ARN	<i>rpoB</i> (ARN polymérase)
Pyrazinamide (PZA) ⁽³⁾	La protéine ribosomale S1 Inhibition de l'activité de traduction de RpsA par le POA	<i>RpsA pncA</i> (pyrazinamidase)
Ethambutol (EMB) ⁽⁴⁾	L'arabinosyl-transférase Inhibition de la biosynthèse de l'arabinogalactan de la paroi cellulaire	<i>embCAB</i> (arabinosyl-transférases)

⁽¹⁾(Banerjee et al., 1994 ; Lei et al., 2000 ; Rozwarski et al., 1998 ; Zhang et al., 1992). ⁽²⁾(Levin et Hatfull, 1993).

⁽³⁾(Konno et al., 1967; Shiet al., 2011). ⁽⁴⁾(Belanger et al., 1996).

Tableau II : Les antibiotiques de seconde ligne, leurs cibles cellulaires et les mécanismes de résistance chez les mycobactéries.

Antibiotiques	Cible(s) cellulaire(s)	Conséquence(s)	Gène impliqué dans la résistance
<u>Aminoglycosides</u> ⁽¹⁾			<i>rrs</i> (ARN16S)
Kanamycine, amikacine, Streptomycine	Sous-unité ribosomale 30S (ARN 16S)	Inhibition de la synthèse protéique	<i>rpsL</i> (Protéine ribosomale S12) <i>gidB</i> (Méthyltransférase de l'ARN16S)
<u>Peptides cycliques</u> ⁽²⁾			<i>rrs</i> (ARN16S)
Capréomycine, Viomycine	ARN16S et ARN23S	Inhibition de la synthèse protéique	<i>tlyA</i> (Méthyltransférase de l'ARNr)
<u>Fluoroquinolones</u> ⁽³⁾			<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> (ADN gyrase)
Ciprofloxacine, Ofloxacine	ADN gyrase	Inhibition de la transcription, de la réplication et de la réparation de l'ADN	<i>lfrA</i> (Pompe à efflux) <i>mpfa</i> (Protéine à motifs pentapeptidiques répétés)
<u>D-cyclosérine</u> ⁽⁴⁾			<i>alr</i> (D-alanineracemase)
	D-alanineracemase (Alr) et D-alanine: D-alanineligase (Ddl),	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	

⁽¹⁾(Moazed et Noller, 1987; Sreevatsan et al., 1996; Okamoto et al., 2007)⁽²⁾(Fu et Shinnick, 2007; Jugheli et al., 2009; Maus et al., 2005b; Maus et al., 2005a; Taniguchi et al., 1997)⁽³⁾(Takiff et al., 1994; Takiff et al., 1996; Hegde et al., 2005)⁽⁴⁾(Di Perri and Bonora, 2004; Caceres et al., 1997).

Il existe deux formes de résistance aux antibiotiques chez *M. tuberculosis*: la résistance acquise, causée par des mutations spontanées qui modifient son génome, et la résistance intrinsèque qui correspond à des mécanismes de défense naturels de la bactérie (Zhang et Jacobs, 2008).

Différents niveaux de résistance acquise chez *M. tuberculosis* ont été distingués : La multi-résistance ou MDR-TB (Multi Drug Resistant Tuberculosis) est causée par des souches du bacille tuberculeux résistantes à au moins deux des antibiotiques principaux de première ligne, la RIF et l'INH. L'ultra-résistance ou XDR-TB (Extensively Drug Resistant Tuberculosis) est une MDR-TB qui ne peut être traitée avec les antibiotiques de deuxième ligne les plus efficaces c'est-à-dire les fluoroquinolones et les antibiotiques injectables (Kanamycine, Amikacine et Capréomycine), à cause de la résistance à ces molécules (Gandhi et al., 2006).

DIAGNOSTIC DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

I. Bacilloscopie

Pour mettre en évidence les mycobactéries, la propriété d'acido-alcool-résistance est utilisée. Deux méthodes de coloration sont applicables en routine :

➤ La méthode de Ziehl-Neelsen :

Les frottis sont colorés par la fuchsine phéniquée à chaud, suivie d'une décoloration par l'acide et l'alcool et contre colorés par le bleu de méthylène. Au microscope optique les bacilles (BAAR) apparaissent comme des bâtonnets rouges sur fond bleu.

➤ Avec la méthode fluorescente, où la fuchsine est remplacée par l'auramine, au microscope à fluorescence sous UV, les BAAR apparaissent comme des bâtonnets jaunes-verts brillants sur fond sombre (**Grosset et al., 1990 ; Nolte et al., 1995**).

Cependant, l'examen microscopique manque de sensibilité et de spécificité, puisqu'il faut plus de 10^4 bacilles par millilitre de produit pathologique pour que l'examen soit positif. Malgré ces limites, cet examen est peu coûteux et reste une étape essentielle du diagnostic de la tuberculose, puisqu'il permet un dépistage rapide en quelques heures (**Grosset, 1995**).

II. Culture classique et automatisée

Comme la microscopie, la culture permet de confirmer le diagnostic de la tuberculose. Après décontamination, les échantillons sontensemencés sur des milieux spécifiques. Le milieu solide à l'œuf de Löwenstein -Jensen est le milieu de culture le plus couramment employé, en raison de sa grande sensibilité, de son faible prix de revient et de l'aspect typique qu'y prennent les colonies de *M. tuberculosis*. Lors de la primo-culture, les colonies de *M. tuberculosis* s'y développent en moyenne entre 21 et 28 jours (**Grosset et al., 1990**).

Néanmoins, vue cette lenteur de la croissance sur les milieux solides, d'autres moyens sont mis au point. Ces nouvelles méthodes sont basées sur l'utilisation de plusieurs systèmes automatisés non radioactifs en milieux liquides, dont :

- ✓ La méthode *Mycobacterial growth indicator tube (MGIT)*:c'est une méthode manuelle et automatisable constituée de 960 tubes, contenant 7 ml de bouillon 7H9 Middlebrook modifié. Son principe est basé sur la présence d'un sel de ruthénium (substance fluorescente) au fond du tube. L'intensité de la fluorescence violette croît

lorsque la concentration en oxygène diminue, induite par la multiplication bactérienne (**Piersimoni et al., 2006**). Le système *BACTEC MGIT 960* utilise une méthode de décontamination commerciale standard comprenant le réactif N-acétyl-L-cystéine à 2% de NaOH (*BBL, MycoPrep Becton Dickinson, USA*), ainsi que cinq antibiotiques (Polymixine B, Amphotéricine B, Acide nalidixique, Triméthoprime, Azlocilline) pour réduire le risque de contamination (**Eduardo et al., 2016**). Le délai moyen de croissance sur ce système est d'environ 12 à 14 jours.

✓ La méthode *BacT/Alert* : c'est une technique automatisée basée sur l'acidification du milieu provoquée par le métabolisme bactérien qui entraîne le virage de la couleur de la pastille contenue au fond du flacon. Le délai moyen de croissance est de 13 à 16 jours (**Gravet et al., 2011**).

✓ La méthode *Versa TREK* : il s'agit aussi d'une méthode automatisée qui détecte la croissance bactérienne grâce à des capteurs de pression (**Gravet et al., 2011**) dans la partie supérieure d'un flacon fermé, en surveillant les modifications dans la production ou la consommation de gaz due à la croissance microbienne (**Jabri et al., 2016**).

✓ Le *MBRedox* : est une technique commercialisée sous forme d'un tube de 5ml de milieu de Kirchner, contenant un sel de tétrazolium, incolore en milieu oxygéné. Il se transforme en formazan, de couleur rouge en atmosphère réduite. La présence d'une culture de *M. tuberculosis* se traduit par l'apparition de grains rouge-violet. Le gain de temps de croissance par rapport au milieu de Löwenstein-Jensen semble moins important qu'avec les autres milieux liquides (**Cambau et al., 1999**).

III. Antibiogramme classique et automatisé

La méthode classiquement utilisée pour mesurer la sensibilité aux antibiotiques d'une souche du *complexe tuberculosis* est la méthode des proportions. Elle consiste à ensemercer une quantité connue de bactéries sur des milieux de culture : tubes témoins sans antibiotique et tubes tests contenant l'antibiotique incorporé à une concentration (CMI) définie (**Canetti et al., 1963**). Après incubation, le dénombrement des colonies apparues dans le tube témoin permet de déterminer le nombre total de bacilles ensemençés, tandis que le dénombrement effectué sur le tube test permet de calculer la proportion de bacilles résistants à l'antibiotique incorporé pour l'isolat considéré (**Gerome et al., 2003**). La méthode est effectuée à partir de la primo-culture, sur milieu solide de L-J., ou à partir du prélèvement si le résultat de l'examen microscopique est positif.

L'antibiogramme standard, qui mesure la sensibilité aux antibiotiques de première ligne, donne de bons résultats sauf avec le pyrazinamide. Ce dernier n'est actif qu'à un pH très acide, ce qui est défavorable à la croissance de *M. tuberculosis* (**Truffot-Pernot et Veziris, 2011**). Lorsque des rechutes ou des échecs thérapeutiques sont constatés, il devient indispensable de vérifier la sensibilité, de la souche infectante, aux antibiotiques de seconde ligne (**OMS, 2008**).

Comme la méthode des proportions, l'antibiogramme en milieu liquide vise à évaluer la proportion de mutants résistants au sein d'une souche. Ces méthodes reposent sur l'utilisation de deux milieux de culture liquide, le *MGIT* (l'automate *BACTEC MGIT 960*) et le *Versa TREK*. Les réactifs nécessaires sont commercialisés sous la forme de deux trousseaux, l'un comportant l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et, pour le *MGIT*, la streptomycine, l'autre comporte le pyrazinamide (**Rusch-Gerdes et al., 2006**).

IV. Techniques moléculaires

✓ Technique d'amplification génique (PCR) :

C'est une technique basée sur la détection et l'amplification d'une séquence nucléique spécifique du *complexe tuberculosis*. Elle possède un seuil de sensibilité et de spécificité très élevée puisqu'il suffit qu'une molécule d'ADN ou d'ARN soit présente pour que le MTb soit détecté. Cependant elle ne permet pas la distinction entre un BK mort et un vivant. Elle ne reconnaît pas également certaines mutations existantes (**Boehme et al., 2011 ; Hillemann et al., 2011**).

✓ Xpert MTB/RIF (GeneXpert) :

Il s'agit d'une PCR en temps réel automatisée qui détecte la présence du MTb en même temps que les mutations les plus fréquentes, conférant la résistance à la rifampicine, en moins de 2 heures. Sa sensibilité est supérieure à 95 % lorsqu'il s'agit de prélèvements respiratoires ayant un examen direct positif. Mais cette sensibilité varie entre 65 et 77 % en cas d'examen microscopique négatif. Cela peut s'expliquer par le fait que l'extraction des acides nucléiques se fait automatiquement dans la cartouche, il n'y a ni perte ni contamination par de l'ADN. Sa spécificité est très élevée (97 % à 100 %) (**Slim-Saidi et al., 2015**). Son apport dans le diagnostic de la tuberculose extra-pulmonaire est intéressant puisque sa sensibilité est de 77,3 % et sa spécificité est de 98,2 %. Cependant, un examen GeneXpert négatif n'exclut pas le diagnostic de tuberculose (**Jabri et al., 2016**).

V. Utilisation des marqueurs biologiques

Des méthodes moins lourdes, moins coûteuses et ne faisant pas appel à la biologie moléculaire ont été mises en place. Deux marqueurs biologiques ont démontré leur utilité pour le diagnostic, l'un pour la recherche de tuberculose directement chez le patient : le lipoarabinomannane qui est un glycolipide de haut poids moléculaire, résistant à la température, présent dans la paroi cellulaire des mycobactéries. Cette molécule n'est pas spécifique pour le complexe MTb, mais plusieurs groupes ont montré la présence de concentrations mesurables de lipoarabinomannane dans les expectorations (**Pereira Arias-Bouda et al., 2000**) ou dans les urines de patients atteints de tuberculose (**Boehme et al., 2005**). Des données préliminaires positives ainsi que l'avantage d'utiliser un simple test urinaire pour détecter une tuberculose ont rapidement conduit au développement d'un test Elisa commercial (**Daley et al., 2009 ; Mutetwa et al., 2009**).

L'autre méthode pour l'identification rapide des mycobactéries du complexe MTb, est applicable dès la positivité de la culture sur *MGIT*: Antigène MPT-64 qui est le seul test commercial de détection antigénique. Ce test est basé sur un dosage immunochromatographique conçu pour la détection de la protéine MPT-64 à partir d'un tube positif. Cette protéine permet une confirmation de l'appartenance au complexe MTb avec une très bonne sensibilité et spécificité. Quelques souches de *M. bovis BCG* ne produisent pas cet antigène MPT-64. L'exécution de ce test en 15 minutes, son coût plus faible que les méthodes moléculaires et l'emploi de techniciens peu spécialisés pour sa lecture, en font néanmoins un outil très performant dans les laboratoires diagnostics actuels (**Ismail et al., 2009 ; Park et al., 2009**).

PARTIE PRATIQUE

Partie II : MATERIEL ET METHODES

I. Cadre de l'étude et objectifs du travail

Le laboratoire de la tuberculose et des mycobactéries de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA) occupe une place primordiale dans la lutte contre la tuberculose en Algérie, en plus d'être le laboratoire national de référence pour cette maladie. Il est chargé de :

- Faire le diagnostic et l'étude de la sensibilité aux antituberculeux de première et de deuxième ligne,
- Former et conseiller le personnel au niveau des différents services nationaux de control de la tuberculose et des maladies respiratoires (SCTMR),
- Superviser et contrôler tout le réseau de laboratoire intervenant dans le diagnostic de la tuberculose et de sa résistance aux antituberculeux.

La présente étude a pour objectif d'évaluer l'apport du *BACTEC MGIT 960* dans le diagnostic et l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, comparé à la culture classique. Ainsi que de vérifier la sensibilité et la spécificité de ce système automatisé (*BACTEC MGIT 960*) dans l'étude de la sensibilité aux antituberculeux.

Il s'agit d'une étude rétro-prospective, s'étalant sur une période de 16 mois (Janvier 2016 à Avril 2017). L'analyse bactériologique des prélèvements est réalisée au niveau du service de la tuberculose et des mycobactéries de l'IPA. Le matériel et les différents produits utilisés sont donnés en annexe n°1.

II. Prélèvements

Trois types de prélèvements pulmonaires ont été inclus dans l'étude: expectoration, tubage gastrique et aspiration bronchique.

Le recueil de ces prélèvements s'est fait dans des crachoirs propres, qui se ferment de manière étanche. Chaque prélèvement acheminé au laboratoire est accompagné d'une fiche de renseignements sur le malade prélevé. Les crachoirs ont été soigneusement identifiés par une étiquette portant un numéro d'ordre du registre du laboratoire.

La conservation des prélèvements se fait à + 4°C au réfrigérateur et peuvent y rester pendant 3 jours à une semaine maximum.

III. Bacilloscopie

III.1. Confection du frottis:

- ✓ Les frottis sont effectués directement à partir du prélèvement ou du culot de décontamination.
- ✓ Des lames neuves, identifiées en marquant en bas de chaque lame le numéro du prélèvement, sont utilisées,
- ✓ A l'aide d'une pipette pasteur ou anse de platine préalablement flambée et refroidie, une parcelle du prélèvement est étalée par un mouvement circulaire excentrique sur une longueur de 2 cm et une largeur de 1 cm, sous hotte microbiologique.
- ✓ La lame est fixée par 3 passages rapides (3 à 5 secondes) à travers la flamme du Bec Bunsen. Ensuite la lame est placée sur le support lame à coloration.

III.2. Coloration de Ziehl-Neelsen :

➤ Coloration à la Fuchsine

- ✓ Le frottis est entièrement recouvert par la fuchsine phéniquée préalablement filtrée,
- ✓ Puis chauffé très doucement jusqu'à émission de vapeurs, en évitant l'ébullition du colorant. Si nécessaire, de la fuchsine est rajoutée.
- ✓ L'opération est répétée 3 fois, en laissant agir le colorant pendant 3 minutes.
- ✓ Enfin, la lame est rincée à l'aide d'un filet d'eau de robinet.

➤ Décoloration par le mélange acide sulfurique alcool

- ✓ La lame est couverte d'acide sulfurique à 25 %, laissée agir pendant 3 minutes, puis rincée à l'eau.
- ✓ Ensuite, une solution d'alcool à 95 % est utilisée pour continuer la décoloration du frottis, puis laissée agir pendant 5 minutes avant le rinçage à l'eau.

➤ Contre coloration

La lame est recolorée par la solution de bleu de méthylène filtré sur papier, laisser agir pendant 1 minute, puis rincer à l'eau.

L'observation des frottis se fait au grossissement à l'objectif à immersion (objectif 100). Une observation d'au moins de 300 champs est nécessaire avant de rendre un résultat négatif. Cette lecture est faite comme montré dans la figure suivante.

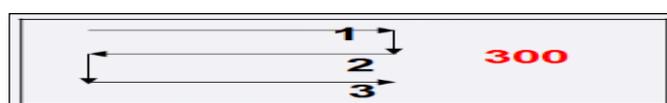


Figure 2 : Lecture en créneau d'une bacilloscopie.

Les mycobactéries apparaissent comme de fins bacilles roses sur un fond bleu (Tableau III).

Tableau III : Expression des résultats d'une bacilloscopie.

Statut du frottis	Nombre de bacilles observés par nombre de champs microscopiques	Résultat de la Microscopie
Frottis négatif	0 bacille sur 300 champs	0
Frottis douteux	1 à 9 bacilles sur 300 champs	Douteux, à Refaire
Frottis positif faible	10 à 99 bacilles sur 100 champs	(1+) ou (+)
Frottis positif moyen	1 à 10 bacilles par champ, (moyenne sur 10 champs)	(++)
Frottis positif riche	>10 bacilles par champ, (moyenne sur 10 champs)	(+++)

IV. Culture

IV.1. Méthode classique:

➤ Décontamination par le NaOH

Les prélèvements poly-microbiens, tels que les crachats, tubages gastriques et aspirations bronchiques sont soumis à une décontamination préalable avant leur mise en culture. La technique de décontamination utilisée est celle de Petroff, basée sur l'utilisation de la soude à 4%, sans neutralisation :

- ✓ Dans un tube à centrifuger, 2 ml de crachat sont placés et additionnés de 4 ml de NaOH 4 %,
- ✓ Le mélange est agité pendant 15 minutes, puis centrifugé à 3000 g pendant 15 mn,
- ✓ Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec de l'eau distillée (10 à 15 ml),
- ✓ Une deuxième centrifugation à 3000 g pendant 15 mn est effectuée et le surnageant est délicatement enlevé.

➤ Mise en culture des différents prélèvements

- ✓ Pour chaque prélèvement, 2 tubes de Löwenstein-Jensen (L-J) sont ensemencés, à partir du culot par une pipette pasteur.
- ✓ Le numéro du prélèvement et la date d'incubation sont mentionnés sur chaque tube,
- ✓ Les tubes ensemencés sont incubés à 37°C en atmosphère normale.
- ✓ Afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide, les vis des tubes restent desserrées pendant les 3 à 4 premiers jours,
- ✓ Les tubes sont vérifiés au cours de la première semaine de culture, en recherchant la croissance de germes banals et/ou le changement de couleur, afin de contrôler la qualité de la décontamination,
- ✓ Les colonies de *Mycobacterium tuberculosis* ne sont visibles à l'œil nu qu'à partir de la 3^{ème} semaine d'incubation (aspect en chou-fleur).

- ✓ En cas d'apparition de colonies, un résultat quantitatif et qualitatif est donné par dénombrement de leur nombre dans chacun des 2 tubes de L-J,
- ✓ Si la culture est négative, les tubes sont remis à l'étuve jusqu'au 42^{ème} jour pour une deuxième lecture.
- ✓ En cas d'absence de colonies, une 3^{ème} et dernière lecture est effectuée au 72^{ème} jour.

IV.2. Méthode automatisée (*BACTEC MGIT 960*) :

➤ **Décontamination par méthode Kubica**

Avant de procéder à l'inoculation des tubes MGIT, les échantillons sont traités en utilisant la trousse *BBL MycoPrep* contenant un mélange de N-acétyl-L-cystéine et de la soude à 2 % (NALC-NaOH) et en suivant le Protocole suivant :

- ✓ Deux ml de prélèvement sont transvasés dans un tube à centrifuger stérile.
- ✓ Un volume égal de solution NALC-NaOH activée est ajouté au tube.
- ✓ Le mélange est ensuite agité pendant environ 30s au Vortex, puis placé dans un agitateur de Khan pendant 20 min.
- ✓ Une solution de tampon phosphate (pH=6,8), préparée au préalable, est utilisée pour atteindre un volume final de l'échantillon à 50 ml.
- ✓ Une centrifugation à 3000 g pendant 20 min est réalisée.
- ✓ Le surnageant est éliminé et deux ml de tampon phosphate (pH=6,8) sont ajoutés, afin de remettre en suspension le culot récupéré.

➤ **Ensemencement des flacons**

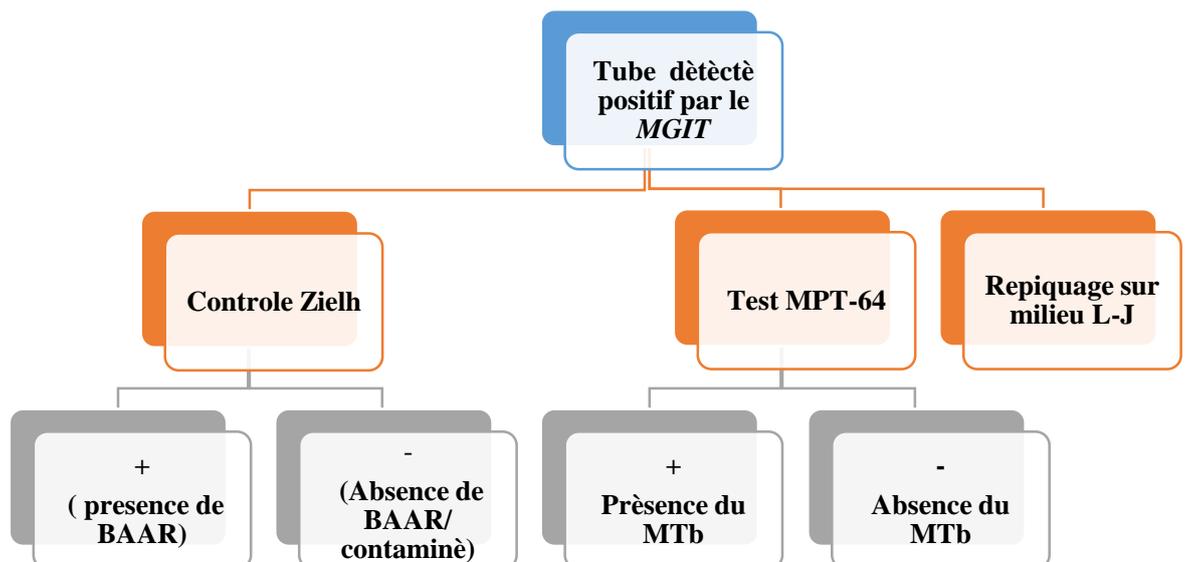
- ✓ Une ampoule lyophilisée du complexe d'antibiotique *BBL MGIT PANTA* (Polymexine B, Amphotéricine B, Acide Nalidixique, Triméthoprime et Azlocilline) est reconstituée avec 15ml de supplément de croissance *BACTEC MGIT OADC* (Oleic Acide, Albumine, Dextrose et Catalase).
- ✓ Le tube *BBL MGIT* 7ml est étiqueté en mentionnant le numéro de l'échantillon et la date d'inoculation,
- ✓ Le capuchon est dévissé et 0,8 ml du mélange supplément de croissance/complexe d'antibiotiques *BBL MGIT PANTA* est ajouté de manière aseptique,
- ✓ En suite, 0,5 ml de la suspension du culot récupéré est ajouté et le tube est bien mélangé et hermétiquement fermé.

- ✓ Les tubes sont immédiatement placés dans l'appareil *BACTEC MGIT 960* et sont incubés sans interruption à 37°C. Un control de ces derniers est effectué toutes les 60 min par l'automate, à la recherche d'une augmentation de la fluorescence.

➤ **Traitement des flacons positifs et négatifs**

Les tubes détectés positifs par l'appareil *BACTEC MGIT 960* sont systématiquement repiqués sur milieux L-J et un frottis est réalisé pour chaque tube afin de rechercher les bacilles acido-alcoololo-résistants (Contrôle ZIELH). Un frotti positif pour la coloration de ZIELH indique la présence de mycobactéries, tandis que le négatif avec observation d'autres microorganismes que les BAAR indiquent une contamination du tube. Si rien n'est observé sur le frottis (ni BAAR, ni autres microorganismes), le tube est remis dans l'instrument dans un délai maximum de 5h après l'avoir retiré. Une identification par test rapide immuno-chromatographique *TBC ID* est ensuite appliquée pour quelques tubes positifs, en procédant comme suit :

- ✓ Le dispositif *TBC ID* est retiré de sa pochette en aluminium immédiatement avant son utilisation, est étiqueté et numéroté.
- ✓ Le tube *MGIT* est bien mélangé par agitation et à l'aide d'une pipette stérile, 100µl de l'échantillon sont déposés dans le puits du dispositif.
- ✓ Au bout de 15min le résultat est lu et enregistré. L'apparition de deux bandes est une confirmation d'un test positif (une pour le test entamé, l'autre spécifique à la protéine MPT-64 des BK).



V. Antibiogramme

V.1. Antibiogramme sur milieu Solide

➤ Préparation l'inoculum

- ✓ Un tube stérile est identifié par le numéro (1), puis deux tubes de Kahn par (-2) et (-4). Ces 3 tubes servent pour la préparation de dilutions.
- ✓ A l'aide d'une anse de platine, un grand nombre de colonies est prélevé de la surface d'un tube de culture L-J positif.
- ✓ Les colonies sont déposées dans un Erlen Meyer stérile, contenant des billes de verre de 6 mm de diamètre.
- ✓ L'Erlen Meyer est mis sous agitation pendant 10min, afin de bien dissocier les colonies avec les billes de verre.
- ✓ Puis, 1 ml d'eau distillée est ajoutée suivie d'une agitation de 10 à 15 s.
- ✓ La suspension est transférée dans le tube portant le numéro (1) (suspension mère).
- ✓ L'opacité de la suspension est ajustée par rapport à l'opacité d'une suspension bacillaire de BCG à 1mg /ml par ajout d'eau distillée stérile.
- ✓ A partir de la suspension mère, les dilutions 10^{-2} et 10^{-4} sont préparées dans les deux tubes de Kahn par (-2) et (-4) déjà numérotés.

➤ Ensemencement

- ✓ Pour une culture provenant d'un patient non traité, deux tubes L-J simples (sans antibiotique) sont ensemencés par chaque dilution, comme des témoins.
- ✓ Des tubes L-J contenant les 4 antibiotiques majeurs à savoir l'Isoniazide (0,2 mg/ml), la Streptomycine (4 mg/ml), la Rifampicine (40 mg/ml) et l'Ethambutol (2 mg/ml), sont ensemencés par la suspension mère et la dilution (-2).
- ✓ Des tubes contenant des milieux spécifiques (TCH, PNB et PAS) pour la confirmation de l'identification sont ensemencés par la suspension mère (Tableau IV).

Tableau IV : Identification des mycobactéries sur milieux spécifiques.

	TCH	PNB	PAS
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-
<i>M. bovis</i>	-	-	+/-
<i>NTM</i>	+	+	+

TCH : Hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique.

PNB : P-nitro benzoïque.

PAS : Acide Para-amino Salicylique.

- ✓ Pour un malade sous traitement ou déjà traité : La même procédure précédente est respectée, en plus de l'ajout des antibiotiques Kanamycine (20 µg/ml) et Ofloxacine (2 mg/ml) pour la suspension mère et la dilution (-2).
- ✓ A l'aide d'une anse calibrée; une goutte de chaque dilution est ensemencée sur les tubes de L-J lui correspondant.
- ✓ Les bouchons des tubes sont légèrement dévissés pour permettre l'évaporation du liquide.
- ✓ Les tubes sont incubés à 37 °C en position horizontale. Les bouchons sont hermétiquement revissés après 3 à 7 jours d'incubation.

➤ **Interprétation**

La lecture est effectuée à partir du 21^{ème} au 28^{ème} jour. Une deuxième et dernière lecture est faite au 42^{ème} jour (si nécessaire). Il faut d'abord commencer à vérifier la pousse sur les témoins et puis sur les tubes d'identification.

Puis compter le nombre de colonies soigneusement, quelle que soit leur taille, sur les tubes témoins (nombre de bacilles viables) et sur les tubes avec antibiotique (nombre de bacilles résistants).

Après dénombrement des colonies sur les deux types de tubes (témoin et avec antibiotiques), un rapport de proportion entre le nombre de colonies ayant poussées sur les tubes avec antibiotiques et le nombre de colonies sur les tubes témoins, est exprimé en pourcentage. En dessous de 1% "proportion critique", la souche est sensible, au-dessus ou égale à 1%, elle est résistante.

Les MDR ont fait l'objet d'antibiogramme de 2eme ligne pour vérifier l'existence d'isolats XDR.

V.2. Antibiogramme sur milieu liquide (*MGIT*)

➤ **Préparation de l'inoculum**

- ✓ Le premier jour de positivité d'un tube de culture *MGIT* est considéré comme jour « J-0 ». Les inocula pour l'antibiogramme doivent être préparés entre le « J-1 » et le « J-5 ». Cependant, un tube positif depuis plus de cinq jours doit être repiqué dans un nouveau tube *MGIT* (contenant 0,8ml de supplément de croissance *BACTEC MGIT* et 0,5ml solution mère).
- ✓ 5 tubes sont étiquetées pour chaque isolat à tester, un tube témoin de croissance (TC) et 4 tubes contenant les antibiotiques ; SM (1µg/ml), INH (0,1µg/ml), RIF

(1ug/ml), EMB (5ug/ml). Placer les tubes dans l'ordre indiqué dans un support AST.

- ✓ 0,8ml de supplément *BACTEC MGIT SIRE* sont ajoutées stérilement à chaque tube.
- ✓ A l'aide d'une micropipette, 100µl de la solution d'antibiotique (SM, INH, RIF, EMB) sont stérilement pipetés dans les tubes correspondant à ATB convenablement étiqueté.

➤ **Préparation et ensemencement des tubes témoins**

- ✓ S'il s'agit d'un tube positif au jour 1 ou au jour 2 : 0,1ml de la solution mère est stérilement pipeté dans 10ml d'eau distillée (dilution 1 :100), 0,5 ml de la suspension est ensemencé dans le tube *MGIT* étiqueté TC (pour témoin de croissance).
- ✓ S'il s'agit d'un tube positif au 3^{ème}, 4^{ème} ou au 5^{ème} jour: 1 ml de bouillon positif doit être dilué dans 4 ml d'eau distillé (dilution 1:5), puis à partir de cette solution faire une dilution de 1 : 100 en ajoutant 0,1 ml dans 10ml d'eau distillé, ensemencer 0,5 ml de la suspension de témoin de croissance (dilution 1 :100) dans un tube *MGIT* étiqueté TC.

➤ **Préparation et ensemencement des tubes contenant les antibiotiques**

- ✓ S'il s'agit d'un tube positif au jour 1 ou au jour 2 : utiliser la suspension de bouillon *MGIT* pour procéder à l'ensemencement, bien mélanger le tube, pipeter 0,5ml dans chaque tube.
- ✓ S'il s'agit d'un tube positif au 3^{ème}, 4^{ème} ou au 5^{ème} jour: utiliser la solution diluée au 1:5 préparé précédemment et pipeter 0,5 ml dans chaque tube.

➤ **Lecture et interprétation**

La lecture est effectuée automatiquement par l'automate toutes les 60 minutes, le test de sensibilité est détecté positif entre 5 à 12 jours, et le résultat est obtenu sous forme d'un rapport imprimé (Annexe 5).

➤ **Analyse statistique**

Un test statistique Khi 2 est effectué pour les différentes analyses réalisées afin de montrer s'il existe une différence significative entre les deux techniques.

***RESULTATS ET
DISCUSSION***

Partie III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Durant la période allant de janvier 2016 à avril 2017, **914** prélèvements ont été réceptionnés par le laboratoire de la tuberculose de l'IPA. Ces prélèvements ont fait l'objet d'une culture et d'un antibiogramme sur milieux solide et liquide.

Les objectifs de notre travail consistaient premièrement, à évaluer le taux et le temps de détection de *M. tuberculosis* avec le *BACTEC MGIT 960* en comparaison avec le milieu solide de L-J. Deuxièmement, vérifier la sensibilité et la spécificité des antibiogrammes réalisés par les deux méthodes précédentes.

I. Diagnostic des infections par *M. tuberculosis*

Sur **914** prélèvements reçus par le service des Mycobactéries de l'IPA, 95 ont été positifs à la Bacilloscopie (B+) et 819 négatifs à cette examens direct (B-).

Tous ces prélèvements ont été ensemencés sur milieux solide L-J et automatisé MGIT, afin d'isoler les bactéries du complexe *M. tuberculosis* suspectées. Les cultures étaient positives pour 179 échantillons (19,58%) dans au moins un type de culture.

Parmi ces 179 cas positif, 155 ont été révélés sur milieux *MGIT*, ce qui présente un taux d'isolement de 86,59% pour cette méthode. Ces isolats ont été identifiés par un contrôle Ziehl, un test immuno-chromatographique MPT64 et un repiquage sur L-J, réalisé à partir de la primo-culture dès la positivité du tube *MGIT*. (Figure n° 3)



(a) : Contrôle Ziehl

(b) : Test MPT-64

(c) : Repiquage sur L-J

Figure 3 : Tests d'identifications de *M. tuberculosis* à partir d'une primo-culture du tube *MGIT*.

Cependant, sur le milieu solide L-J, seulement 123 isolats sur les 179 (68,71%) ont été identifiés.

Le *MGIT* était plus sensible que le L-J, une différence statistiquement significative est observée entre les deux méthodes concernant le diagnostic de la tuberculose, puisque le test de Khi2 a donné une valeur de $P=0,037$.

L'addition de *MGIT* a donc amélioré le taux d'isolement de 17,88%. En comparant le taux d'isolement obtenu par la combinaison des deux milieux *MGIT/L-J* avec chaque milieu séparé.

Néanmoins, sur les 179 cas positifs enregistrés, la culture sur *MGIT* a révélé la présence de 75 isolats dont la bacilloscopie était négative. Contrairement à la culture sur milieu solide, seul 44 cas ont été diagnostiqués positifs. Ceci confirme la sensibilité élevée du système *MGIT* dans la détection des cas positifs mais pauvres en bacilles pour être détecté à l'examen direct. Ceci est confirmé par le test statistique ($p=0,014$) (Tableau V).

Tableau V: Isolement de *M. tuberculosis* sur le *MGIT* et sur L-J.

		<i>MGIT</i>	L-J	<i>MGIT+L-J</i>
Bacilloscopie Positive	95	80	79	71
Bacilloscopie Négative	819	75	44	28
Total	914	155	123	99

Parmi les 95 cas à bacilloscopie positive, 6 cas n'ont pas donné de culture positive ni sur *MGIT* ni sur L-J.

Le taux de contamination était plus élevé avec la culture sur L-J : 81 /914 (8,86%), dont 7 isolats étaient bacilloscopie positive, alors que sur le *MGIT*, ce taux n'est que de 3,17% (29/914), avec aucun cas à bacilloscopie positive. Ceci est statistiquement confirmé ($p< 0,0001$).

Au total, 80 cas de discordance ont été observés, les 44 isolats positifs sur *MGIT* étaient négatifs sur L-J (3B+ et 41 B-). De plus, de 12 autres cas positifs sur *MGIT* étaient contaminés sur L-J (6 B+ et 6 B-). Sur milieu L-J, 23 cas positifs (8B+ et 15B-) en culture étaient négatifs sur *MGIT* (Tableau VI).

Tableau VI : Discordances observées entre le *MGIT* et le L-J

Bacilloscopie	L-J+/MGIT-	MGIT+/L-J-	MGIT+/L-J contaminé	L-J+/MGIT contaminé
Positive	8	3	6	0
Négative	15	41	6	1
Total	23	44	12	1

L-J+/MGIT- : discordance en faveur du L-J ; MGIT+/L-J- : discordance en faveur du *MGIT*.

Les temps de détection de la première croissance *M. tuberculosis* sur *MGIT* et L-J sont variables, comme les résume le tableau ci-dessous. Pour la culture sur *MGIT*, les échantillons à bacilloscopie positive apparaissent au bout du 7eme jour en moyen. Ce délai est de 13 jours pour les échantillons à bacilloscopie négative, en moyenne. Cependant, en culture classique sur L-J, les délais moyens sont de 28 jours pour les cas à bacilloscopie positive de 42 jours pour les cas à bacilloscopie négative. Le test Khi2 (p=0.019) a confirmé l'efficacité du système *MGIT* dans la réduction des délais de diagnostic de la tuberculose.

Tableau VII: Temps moyen de détection de *M. tuberculosis*.

Temps en jours		
Bacilloscopie	<i>MGIT</i>	L-J
Positive	07 Jours (3-10 jours)	28 Jours (21-42 jours)
Négative	13 Jours (12-36 jours)	42 Jours (28-60 jours)

Discussion :

Durant les dernières décennies, il y'a eu une recrudescence importante de l'incidence des infections tuberculeuses. Il est évident que l'augmentation des facteurs favorables à cette maladie ainsi que l'émergence de souches multi résistantes aux antituberculeux, soient des problèmes de santé majeur pour la communauté internationale. Que ce soit dans les pays développés ou en voie de développement (**Levidiotou et al., 1999**).

Cette situation alarmante a conduit à la recherche et au développement de moyen de dépistage et de traitement plus rapide et efficaces, dans le but de réduire les taux de mortalité. La course contre cette maladie est justifiée, entre autres, par le fait qu'elle soit la plus mortelle, devant le SIDA en 2014 (**OMS, 2015**).

Le développement de nouvelles méthodes de diagnostic ne date pas d'hier, ce qui a conduit à la mise en place de plusieurs systèmes. A titre d'exemple, *Versa TREK*, *BACTEC 460*, *MBRedox*, *BACTEC MGIT 960*...etc sont des moyens de diagnostic approuvés et déjà utilisés en pratique. Néanmoins certains d'eux semblent moins efficaces que d'autres.

Certaines études ont démontré que la combinaison du milieu liquide et solide est un principe incontournable pour le diagnostic de la tuberculose (**Shinnick & Jonas, 1994 ; Badak et al., 1996**). Néanmoins, dans la plupart des laboratoires africains, cette combinaison est rarement disponible, du fait que le coût des milieux liquides soit élevé. Ce qui fait que seul le milieu solide (L-J) est utilisé pour la culture et l'antibiogramme (**Macondo et al., 2000**).

Parmi les systèmes de cultures automatisés des mycobactéries, le *BACTEC MGIT 960* a démontré une bonne sensibilité et une excellente capacité à raccourcir le temps de détection de croissance (**Tortoli et al., 1999**). Jusqu'à aujourd'hui, un certain nombre d'études ont été réalisées dans le monde entier sur l'efficacité du diagnostic de la tuberculose par ce système sur les échantillons cliniques (**Augustynowicz-Kopec et al., 2002 ; Cruciani et al., 2004**).

L'objectif de ce travail consiste à comparer la sensibilité, la spécificité ainsi que le temps de détection entre la culture classique sur milieu solide L-J et le système automatisé en milieu liquide *BACTEC MGIT 960*.

Durant une période de 16 mois, 914 échantillons collectés par l'IPA ont été cultivés, 179 (19,58%) étaient positifs. Sur ces 179 souches, 68,71% ont été détectées sur milieu L-J et 86,59% sur *MGIT*, soit une différence de 17,88%. Ce résultat est confirmé statistiquement ($p=0,037$). L'utilisation synchrone du *MGIT* et L-J augmente la sensibilité de la méthode de culture, comme décrit dans les études de **Lee et Hassan & leurs collaborateurs**, qui ont respectivement obtenus des taux de 10,65% et 23,8% (**Lee et al., 2003; Hassan et al., 2013**).

Contrairement au milieu solide, le milieu liquide a l'avantage de récupérer les bactéries présentes dans l'échantillon même à un nombre réduit, mais aussi les bactéries stressées par le traitement précédant la culture (**Macondo et al., 2000**). Néanmoins, certaines autres études ne trouvent pas de différence significative entre les deux méthodes (**Badak et al., 1996 ; Levidiotou et al., 1999 ; Saito et al., 1996 ; Rivera et al., 1997**).

L'étape la plus importante dans le diagnostic de la tuberculose, est la différenciation entre *M. tuberculosis* et les autres espèces. Les primo-cultures obtenues sur *MGIT* sont identifiables par un contrôle Ziehl, test immuno-chromatographique MPT-64,

et un éventuel repiquage sur milieu L-J. Pour cela le CDC (Center for Disease Control) recommande l'utilisation d'une combinaison de milieu liquide et solide pour l'obtention d'un meilleur rendement (**Hanna et al., 1999 ; Yan et al., 2000 ; Kanchana et al., 2000**).

Pfyffer & ses collaborateurs ont montré que la combinaison de deux milieux liquides n'améliore pas le rendement de culture de façon significative, comparé à la combinaison milieu liquide-milieu solides (**Pfyffer et al., 1997**).

Sur le plan du diagnostic, 10,39% (95/914) des isolats sont positifs à la bacilloscopie. Parmi les 179 isolats détectés positifs à la culture, 49,72 % (89/179) à B+ et 50,27% (90/179) à B- . Les discordances entre l'examen direct positif et la culture négative sont dues, d'une part, au fait que les BAAR observés ne puissent être cultivés, d'autre part, aux problèmes de délai d'acheminement ainsi que la conservation des prélèvements qui normalement doit être maintenu à +4° C (**Grosset et al., 1995 ; Murray et al., 1980**).

Pour les résultats négatifs en examen direct et qui sont positifs en cultures, ils sont dues au fait qu'il doit y'avoir 5000 à 10000 bacilles par millilitre d'échantillon pour permettre la détection des bacilles, tant dis que la culture peut détecter seulement 10 bacilles par millilitre (**Hobby et al., 1973**).

Le *MGIT* a montré une bonne sensibilité en isolant 22,91% (41/179) des souches à partir d'échantillons B- qui ont donc échappé au diagnostic par bacilloscopie et par culture sur L-J. Alors que le L-J a détecté 8,38% (15/179) d'isolat à B- et *MGIT* négatifs. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats, entre autres, la méthode et le temps de décontamination, les types de décontaminant ainsi que l'adaptabilité du milieu de culture en facteurs de croissance.

Parmi les différents milieux de cultures pour l'isolement des mycobactéries, le plus commun est à base d'œuf et contient également des concentrations élevées de vert de malachite pour surmonter la contamination avec d'autres bactéries (**Essawy, 2014**), mais cela n'a pas empêché l'apparition d'un taux de contamination de 8,86% sur L-J, qui peut être due à des problèmes lors de la manipulation des échantillons tel une décontamination trop forte, mais aussi l'utilisation de réactifs non stériles (**Murray et al., 1980**).

Feyzioglu & ses collaborateurs (**2014**) ont obtenus un taux de contamination de 6,5% sur ce milieu, cela peut être dû au nombre réduit de prélèvements testés dans leur étude.

Par contre, sur milieu *MGIT* le taux de contamination enregistré dans notre étude est de 3,17%. D'après les travaux de **Bonard** & ses collaborateurs (**1997**) et **Alcaid** & ses collaborateurs (**2000**) réalisés avec le même kit de décontamination, des taux similaires ont

été obtenus. Alors que d'autres études ont obtenu des taux de contamination plus élevés : **7,9%**, (**Leitritz et al.,2001**), **8,1%** (**Hanna et al., 1999**) , **10%** (**Tortoli et al.,1999**), **15,1%** (**Lee et al.,2003**) et **17,1%**(**Williams et al.,2000**).

D'après **Tortoli & ses collaborateurs (1999)**, le taux de contamination élevée sur milieu *MGIT* est probablement dû à la richesse de ce milieu liquide, ce qui favorise non seulement la croissance des mycobactéries, mais aussi celle des autres microorganismes. Mais cette richesse ne semble pas suffisante, si le contaminant n'est pas résistant aux 5 antibiotiques du *PANTA*. De plus, selon **Macondo & ses collaborateurs (2000)**, la concentration du kit de décontamination *MycoPrep* contenant du NaOH à 2%, soit une concentration finale de 1%, paraît insuffisante pour réduire le taux de contamination (**Macondo et al., 2000**).

En général, malgré un respect strict des bonnes pratiques au laboratoire, il existe un risque incompressible de contamination estimé entre 0,5 et 5% (**Morel et al., 2000**), et lors de notre travail, nous avons enregistré un taux de contaminations très appréciable par le *MGIT*.

Le principal avantage du *BACTEC MGIT 960* est le court délai de détection de la positivité des échantillons, sa performance a raccourci le temps de croissance des mycobactéries à une moyenne de 7 jours, qui est beaucoup plus rapide par rapport au milieu solide. Des délais plus longs, de 8,3 à 9,3 ont été rapportés respectivement dans d'autres études (**Feyzioglu et al., 2014 ; Yan et al., 2000 ; Chien et al., 2000**).

Le délai de croissance se raccourcis lorsque les prélèvements sont riche en mycobactéries. En effet, les cultures à microscopies positives poussent plus rapidement que les cultures à microscopie négative, ce qui a été prouvé par certaines études (**Somoskovi et al., 2000 ; Zanetti et al., 1997**).

Une détection rapide, c'est-à-dire en moins de 7 jours avant la période moyenne de positivité sur milieu *MGIT* indique une contamination par les mycobactéries non tuberculosis (NTM) (**Hasan et al., 2013**).

La sensibilité et la rapidité de détection sont les avantages majeurs du *BACTEC MGIT 960*. En plus de la facilité d'interprétation des résultats, cet automate peut comporter à lui seul plus de 900 échantillons.

Les principales différences entre la culture sur milieu *MGIT* et L-J sont ; la taille de l'inoculum qui n'est pas la même (0,1- 0,2 ml pour le L-J et 0,5ml pour le *MGIT*), ainsi que la lecture qui n'est pas faite à la même fréquence. Mais d'après des études faites par **Takahashi & ses collaborateurs et Roberts & ses collaborateurs (1983)**, qui ont utilisé

pour le milieu liquide un inoculum inférieur à celui du milieu solide puis un même volume d'inoculum pour les deux milieux, ont montré que la taille de l'inoculum n'avait aucune influence sur les deux types de milieux.

II. Résistance des souches de *M. tuberculosis* aux antituberculeux

Sur un total de 157 souches de *M. tuberculosis* isolées, identifiées et testées vis-à-vis des 4 antituberculeux de première ligne, 83 (52,86%) ont donné des résultats interprétables, ces derniers sont inscrits dans le tableau ci-dessous .

Tableau VIII: Comparaison de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux 4 antituberculeux de première ligne, testée par deux méthodes différentes.

Nombre de souches	Méthode utilisée							
	<i>MGIT</i>				Méthode des proportions			
	SM	INH	RIF	EMB	SM	INH	RIF	EMB
58	S	S	S	S	S	S	S	S
1	R	R	R	S	R	R	R	S
2	S	R	S	S	S	R	S	S
5	S	R	S	S	S	S	S	S
1	S	S	R	S	S	S	S	S
1	S	S	S	S	S	R	S	S
2	S	R	R	S	S	S	S	S
1	S	S	S	S	R	S	S	S
2	S	S	S	S	S	R	R	S
1	R	R	R	S	S	S	S	S
1	R	R	S	R	R	R	S	S
1	R	R	S	R	S	S	S	S
4	R	S	S	S	S	S	S	S
1	R	R	R	S	R	R	R	R
2	R	R	R	R	S	R	R	S

D'après les résultats obtenus dans cette étude, le temps moyen de lecture des tests de sensibilité était de 8,2 jours pour le *MGIT* et de 21 jours pour le L-J.

Parmi les 83 souches, nous avons observé une concordance pour 61 souches (73,49%) dont 58 sensibles et 3 résistances à au moins un antibiotique, et une discordance pour 22 souches (26,50 %).

Tableau IX : Concordances et discordances sur les deux milieux.

	Concordance		discordance
	S	R	
<i>MGIT/L-J</i>	58	3	22

En comparant les résultats obtenus sur *MGIT* et ceux obtenus sur L-J, nous avons observé une concordance de 73,49%. Le couple *MGIT*/ L-J n'a montré aucune différence statistiquement significative (P=0,064).

Sur les 157 souches testées, les résultats de l'analyse de sensibilité obtenus sur chaque milieu séparément sont mentionnés dans le tableau X, 124 souches sont testées sur *MGIT* et 116 souches sur L-J.

Tableau X : analyse de la sensibilité sur les deux milieux.

	Profile	
	S	R*
<i>MGIT</i>	88	36
L-J	97	19

R* : Résistance à au moins un antibiotique

II.1 .Résultats de chaque antibiotique

➤ Streptomycine (SM) :

Le tableau XI résume les résultats obtenus avec la Streptomycine sur les 157 souches testées sur les deux milieux de cultures *MGIT* et L-J. La valeur du test statistique KHI 2 n'a pas donné de différence statistiquement significative (P=0,063).

Tableau XI: analyse de la sensibilité de la SM sur les deux milieux.

Milieu	S	R
<i>MGIT</i>	102	22
L-J	105	11
<i>MGIT</i> /L-J	71	3

Les résultats de la comparaison entre le *MGIT* et le L-J sont similaires pour 74 souches, dont 71 sensibles et 3 résistantes.

Tableau XII: comparaison de la sensibilité entre le *MGIT* et le L-J pour la SM.

<i>MGIT</i>	L-J	
	S	R
S	71	1
R	8	3

Le couple *MGIT*/L-J a un taux de 89,16% de concordance pour la Streptomycine, soit 74 souches dont 71 sensibles et 3 résistantes, et un taux de discordance de 10,84%.

➤ **Isoniazide (INH) :**

Le résultat global obtenu avec l'isoniazide est résumé dans le tableau XIII. La valeur du test statistique KHI 2 a donné une différence statistiquement significative (P=0,046).

Tableau XIII: analyse de la sensibilité de la INH sur les deux milieux.

Milieu	S	R
<i>MGIT</i>	97	27
L-J	102	14
<i>MGIT</i> /L-J	64	7

Les résultats de la comparaison entre le *MGIT* et le L-J sont similaires pour 71 souches, dont 64 sensibles et 7 résistantes.

Tableau XIV: comparaison de la sensibilité entre le *MGIT* et le L-J pour la INH.

<i>MGIT</i>	L-J	
	S	R
S	64	3
R	9	7

Le couple *MGIT*/L-J pour INH est un taux de 85,54% de concordance, soit 71 souches dont 64 sensibles et 7 résistantes, et un taux de discordance de 14,46%.

➤ **Rifampicine (RIF) :**

Pour les 157 souches testées, les résultats de la sensibilité à la Rifampicine sont résumés dans le tableau ci-dessous. La valeur du test statistique KHI 2 n'a pas donné de différence statistiquement significative (P=0,46).

Tableau XV: Analyse de la sensibilité de la RIF sur les deux milieux.

<u>Milieu</u>	<u>S</u>	<u>R</u>
<i>MGIT</i>	111	13
L-J	107	9
<u><i>MGIT/L-J</i></u>	<u>73</u>	<u>4</u>

Les résultats de la comparaison entre le *MGIT* et le L-J sont similaires pour 77 souches, dont 73 sensibles et 4 résistantes.

Tableau XVI: comparaison de la sensibilité entre le *MGIT* et le L-J pour la RIF.

	<u>L-J</u>	
<u><i>MGIT</i></u>	<u>S</u>	<u>R</u>
S	73	2
<u>R</u>	<u>4</u>	<u>4</u>

Le couple *MGIT/L-J* pour RIF est un taux de 92,77% de concordance, soit 77 souches dont 73 sensibles et 4 résistantes, et un taux de discordance de 7,23%.

➤ **Ethambutol (EMB) :**

Le tableau XVII résume les résultats obtenus avec l'Ethambutol sur les 157 souches testées sur les deux milieux de cultures *MGIT* et L-J. La valeur du test statistique KHI 2 n'a pas donné de différence statistiquement significative (P=0,15).

Tableau XVII : analyse de la sensibilité EMB sur les deux milieux.

Milieu	S	R
<i>MGIT</i>	116	8
L-J	113	3
<i>MGIT/L-J</i>	78	1

Les résultats de la comparaison entre le *MGIT* et le L-J sont similaires pour 78 souches sensibles.

Tableau XVIII: comparaison de la sensibilité entre le *MGIT* et le L-J pour EMB.

	L-J	
<i>MGIT</i>	S	R
S	78	1
R	4	0

Le couple *MGIT/L-J* pour EMB est un taux de 93,98% de concordance, soit 78 souches sensibles.

II.2. Les profils de résistances

Après avoir testé les antibiotiques majeurs (SM, INH, RIF, EMB) sur les 157 souches, 16 souches ont été déclarées résistantes au moins à l'isoniazide et la rifampicine, ce qui représente un taux de MDR de 10,19%.

Tableau XIX: Profils des souches résistantes (MDR).

	<i>MGIT</i>	L-J	<i>MGIT+L-J</i>
Résistant à INH et RIF	11	9	4
Résistant à tout	3	3	0
Résistant à SM INH et RIF	8	5	1

De plus, l'antibiogramme pour les antituberculeux mineurs (Kanamycine, Ofloxacine) par la méthode des proportions sur milieu solide (L-J) a été effectué sur 10

souches appartenant à des patients traités. Parmi eux, 8 souches sensibles aux deux antibiotiques (KM, OFX), une souche résistante à l'ofloxacine seulement, et une dernière souche résistante à l'ofloxacine et kanamycine en plus d'être résistante aux antituberculeux majeurs, ce qui donne un isolat XDR (Patiente âgée de 20 ans, traité).

Discussion :

Bien que le diagnostic, la chimiothérapie, la vaccination soient disponibles, la TB est loin d'être éradiquée en raison de plusieurs facteurs, tel que la résistance aux antibiotiques et la satisfaction dans le secteur de santé public et programme de gestion mal contrôlé de TB (**Kaufmann et al., 2005 ; Noor et al., 2012 ; Rahman et al., 2011**).

Les antibiotiques sont probablement les facteurs les plus importants pour réduire au minimum la diffusion de la contagion. L'étude phénotypique de la résistance de *M. tuberculosis* à ces antituberculeux reste la méthode de choix, les tests de sensibilités en milieux liquides est actuellement la méthode la plus adaptée au niveau des laboratoires, l'avantage est d'accélérer les rapports des résultats. (**Tortoli et al., 2001**).

Dans cette étude, nous avons évalué la fiabilité et la susceptibilité de méthode d'essai qui emploie le système automatisé non radiométrique *BACTEC MGIT 960* en le comparant à la méthode des proportions sur milieu solide dite et considérée comme la méthode « GOLD STANDARD ».

Des 83 résultats interprétables, on a observé une concordance sur 61 souches dont 58 sensibles et 3 résistantes, au moins à un antibiotique, sur les 2 méthodes (73,49%). L'absence de différence statistiquement significative montre que les 2 milieux ont globalement la même valeur. Même si le taux de concordance est inférieur à ceux rapportés par **Cambeau & ses collaborateurs (1996)** qui ont obtenu 81 % de concordance, **Gèrome & ses collaborateurs (1999)** 89% de concordance, alors que **Bergmann & ses collaborateurs (1997)** ont enregistré un taux de concordance de 93,2% entre le milieu *MGIT* et L-J.

Selon les études réalisées par **Palaci (1996), Reisner (1995), Walters (1996)** & leurs collaborateurs, un taux de concordance de 100% en testant la RIF a été obtenu, contrairement aux résultats de notre étude, un taux de 92,77% de concordance avec 73 souches sensibles, et 4 résistantes.

Un taux de concordance de 85,54% est obtenu pour l'INH dont 64 sensibles et 7 résistances sur les deux milieux. Malgré cela une différence statistiquement significative a

été observé pour les résultats obtenus par les deux méthodes ($P=0,046$). **Zapata (1999)** et **Birinci (2002)** & leurs collaborateurs, ont signalé une bonne corrélation en examinant la SM, RIF et EMB, mais plus faible corrélation avec l'INH.

D'après **Walters et Hanna (1996)**, le *MGIT* possède l'exactitude de la méthode des proportions et la vitesse du système BACTEC 460 TB, des études actuellement en cours avec la SM, EMB et PZA indiquent que le *MGIT* peut être une alternative appropriée à ces méthodes.

L'étude de la sensibilité à l'EMB et SM est à l'origine de pourcentage de discordances moins homogènes selon les travaux. **Rusch-Gerdes & ses collaborateurs (1999)** ont décrit des taux de 1,9% pour l'EMB et 0,9% pour SM, par contre **Bergmann & ses collaborateurs (1997)** ont présenté des taux respectifs de 9,5% et 6,8%, alors que dans notre étude des taux de 6,02% et 10,84% sont respectivement obtenus.

Selon **Rusch-Gerdes & ses collaborateurs (1999)**, deux éléments peuvent expliquer ces résultats, d'une part l'hétérogénéité de la résistance à l'ethambutol, qui regroupe une résistance de haut niveau ($CMI > 20 \mu\text{g/ml}$) associée à des mutations du gène *embB*, et de bas niveau ($CMI \leq 10 \mu\text{g/ml}$). D'autre part les concentrations critiques choisies pour la méthode des proportions ou des méthodes qui en dérivent, sont différentes selon les techniques (**Nouhouyai et al., 1996**).

Pour la SM, on distingue également une résistance de haut niveau ($CMI \leq 500 \mu\text{g/ml}$) due à des mutations du gène *rpsL* codant pour la protéine ribosomale S12, et une résistance de bas niveau ($CMI = 10 \mu\text{g/ml}$) (**Cooksey et al., 1996**).

Pour les systèmes liquides actuellement utilisés pour détecter la sensibilité aux antituberculeux, deux concentrations critiques (faible et élevée) ont été défini pour les trois antituberculeux majeurs INH, EMB et SM, alors qu'au niveau du laboratoire de l'IPA uniquement les antituberculeux en concentrations critiques faibles sont disponibles.

La raison des anomalies rencontrées entre les résultats du *MGIT* et de la méthode des proportions n'était pas claire, cependant le manque d'étalonnage de l'inoculum et la représentation des populations de *M. tuberculosis* dans le *MGIT* était la raison principale possible selon **Fang-Lan & ses collaborateurs (2013)**.

Birinci & ses collaborateurs (2002) suggère d'employer le *BACTEC MGIT 960* par habitude au lieu de la méthode des proportions sur milieu solide, vu le temps moyen d'obtention des résultats qui est plus court.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de notre étude réalisée au niveau de l'IPA, les résultats positifs à l'examen direct et la culture sur les deux milieux solide L-J et liquide *MGIT* ont montré une différence statistique significative ($P= 0,037$) dans le diagnostic de la tuberculose.

Sur les 914 prélèvements reçus, seulement 95 échantillons se sont révélés positifs à la bacilloscopie, alors que 179 isolats sont positifs sur les deux milieux de culture L-J et *MGIT*, avec des taux respectives de 123/ 179 (68,71%) et 155/179 (86,59%), dont 99/ 179 concordance enregistré.

L'utilisation de méthodes de décontamination appropriées pour chaque milieu de culture n'a pas empêché l'apparition de contaminants, avec des taux de 8,86% avec le L-J et de 3,17% avec le *MGIT*, cette différence est statistiquement significative ($P < 0,0001$).

Le *MGIT* constitue un bon moyen de diagnostic de *M. tuberculosis*, en plus de sa grande sensibilité et facilité de lecture, sa rapidité de détection représente aussi un avantage, avec un temps moyen de 7 jours pour le *MGIT* et 28 jours pour le L-J, l'analyse statistique ($p=0.019$) a confirmé l'efficacité du système *MGIT* dans la réduction des délais de diagnostic de la tuberculose.

L'étude de la sensibilité aux antituberculeux réalisée sur les 157 souches de *M. tuberculosis* par les deux méthodes de proportions sur milieu solide et liquide, dont 83 résultats interprétables, avec un taux de concordance pour 61 souches et une discordance pour 22 souches, n'a montré aucune différence statistique significative entre les différents résultats obtenus ($P= 0,064$).

Sur les 157 souches testées, 55 isolats se sont révélés résistants à au moins un antituberculeux, une résistance à la rifampicine et l'isoniazide (MDR) est observée pour 16 isolats sur les deux milieux séparément, 12 souches sont résistantes à la streptomycine, isoniazide et rifampicine simultanément, alors que 6 souches sont résistantes à tous les antibiotiques testés (SM, INH, RIF, EMB).

Parmi les 16 MDR obtenu, un cas XDR a été signalé après avoir testé la sensibilité de cette souche aux antituberculeux de deuxième ligne (Kanamycine et Ofloxacine). A notre connaissance, c'est le premier rapport sur la présence d'XDR en Algérie.

Cependant, après l'analyse de plusieurs études faites y compris la nôtre, on conclut que le *MGIT* représente une méthode automatisé efficace et rapide dans le diagnostic de *M. tuberculosis*, mais la culture sur milieu solide L-J reste toujours la méthode de référence, pour cela une combinaison des deux méthodes de diagnostic est recommandée afin d'améliorer le rendement.

Il serait intéressant de combiner les points positifs du système classique et *MGIT* afin de mettre au point un seul système qui rallie l'efficacité, la sensibilité et la spécificité à la réduction du temps de diagnostic.

En plus de cela, il serait préférable de confirmer les résultats par des tests de biologie moléculaire, et typage moléculaire par : RFLP-IS6110, Spoligotyping, MIRU-VNTR 24, afin de déterminer des différentes familles et lineages répondu en Algérie.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

1-Alcaide F, Benitez MA, Escriba JM, et al. (2000). Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/Bac T systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol.* 38: 398–401.

2-Augustynowicz-Kopec E, Jaworski A, Zwolska Z. (2002). Evaluation of Bactec MGIT 960 fluorescent method in diagnosis of tuberculosis, *Pneumonol. Alergol. Pol.* 70 (9–10) (2002) 450–457.

B

3-Badak EZ, Kiska DL, Setterquist S, Hartley C, O'Connell MA, Hopfer R. (1996). Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. 1. *Clin. Microbiol.* 34, 2236-2239.

4-Banerjee A, Sugantino M, Sacchetti JC and Jacobs WR, Jr. (1998). The mabA gene from the inhA operon of Mycobacterium tuberculosis encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiology* 144 (Pt 10), 2697-2704.

5-Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ and Inamine JM. (1996). The embAB genes of Mycobacterium avium encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11919-11924.

6-Bendadda O. (2003). Tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis*: Enquête bactériologique. *Th sc.*

7-Bergmann JS and Woods GL. (1997). Reliability of Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *M. tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. *J.Clin.Microbiol.* 35(12) :3325-3327.

8-Bercion R., Robert Le Vagueresse. (1999). Evaluation Du Milieu Mgit (Mycobacteria Growth Indicator Tube) Pour L'étude De La Sensibilité De *Mycobacterium Tuberculosis* Aux Antituberculeux De Première Ligne.

9-Birinci, Asuman., Yilmaz Coban, Ahmet., Ekinçi, Bora., Durupinar, Belma. (2002). Comparison of the Proportion Method with Mycobacteria Growth Indicator Tube and E-test for Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.* 97(3): 351-352.

10-Boehme C, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R., et al. (2011). Feasibility, diagnostic accuracy and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicenter implementation study. *377*:1495—505.

11-Boehme C, Molokova E, Minja F, et al. (2005). Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ;99:893—900.

12-Bonard D, Akedier E, Bamba L, Yayo C, Kottan Jb et Combe P. (1997). Evaluation du milieu MGIT et du kit Mycoprep pour le diagnostic des infections à mycobactéries. In : abstracts de la 11ème CISMA. Abstr.A1078 p379-380.

C

13-Caceres NE, Harris NB., Wellehan JF, Feng Z, Kapur V and Barletta RG. (1997). Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology* 179, 5046-5055.

14-Canetti G, Rist N, Grosset J. (1963). Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions : méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. *Rev Tuberc Pneumol* 27:217—72.

15-Cambau E, Wichlacz C, Truffot-Pernot C, Jarlier V. (1999). Evaluation of the new MB Redox system for detection of growth of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 37: 2013–5.

16-Cambau E, Wichlacz C, Ouillier G, Truffot-Pernot C, Boulahbal F, Grosset J. (1996). Evaluation du nouveau test de sensibilité aux antituberculeux MGIT-AST (Becton Dickinson). Cinquièmes Journées de mycobactériologie de langue française, Nice, 7-8 novembre.

17-Cegielski JP and McMurray DN. (2004). The relationship between malnutrition and Tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 8, 286-298.

18-Chien HP, Yu MC, Wu MH, et al. (2000). Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*; 4: 866–870.

19-Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT. (1996). Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York city, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 1186-I 188.

20-Cosivi O, Meslen FX, Daborne CJ and Grange JM. (1995). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in animals and humans, with particular reference to Africa. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*; 14: 733-46.

21-Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. (2004). Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.* 42 2321–2325.

D

22-Daley P, Michael JS, Hmar P, et al. (2009). Blinded Evaluation of Commercial Urinary Lipoarabinomannan for Active Tuberculosis: A Pilot Study. *Int J Tuberc Lung Dis* ;13:989—95.

23-Di Perri G, Bonora S. (2004). Which agents should we use for the treatment of multi-drug-resistant mycobacterium tuberculosis, *the journal of antimicrobial chemotherapy* 54, 593-602.

24-Diande S. (2010). Evaluation de la resistance de *mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques et exploration des facteurs de risque associant à la multiresistance au burkina faso. Thèse de doctorat en biochimie et microbiologie. Université de Ouagadougou, unité de formation et de recherche sciences de la vie et de la terre (ufr-svt). 18.

E

25-Eddie M Wampande., Ezekiel, Mupere., Devan, Jaganath., Mary, Nsereko., Harriet K. Mayanja., Kathleen, Eisenach., W Henry Boom., Sebastien, Gagneux., Moses L, Joloba. (2015). Distribution and transmission of mycobacterium tuberculosis complex lineages among children in peri-urban kampala, uganda

26-Eduardo P. Amaral, Elisabete L. Conceição, Diego L. Costa¹, Michael S. Rocha, Jamocyr M. Marinho, Marcelo Cordeiro-Santos⁷, Maria Regina D'Império-Lima, Theolis Barbosa, Alan Sher And Bruno B. Andrade. (2016). N-Acetyl-Cysteine Exhibits Potent Anti-Mycobacterial Activity In Addition To Its Known Anti-Oxidative Functions.

27-Essawy, Tarek S., Saeed, Amal M., Fouad, Nehad A. (2014). Comparative Study Between Using Lowenstein Jensen, Bio-FM Media And Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) System In Identification Of Mycobacterium Tuberculosis Egyptian Journal Of Chest Diseases And Tuberculosis 63, 377–384.

F

28-Fang-Lan Yu , Jau-Ching Lee , Mei-Shiang Wang , Han-Lin Hsu , Tzu-Ting Chen , Chia-Ling Cheng , Yi-Yuan Yang , Giueng-Chueng Wang , Ming-Chih Yu. (2013). Evaluation of a modified direct agar proportion method for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis from MGIT samples.

29-Feyzioglu, Bahadir., Dogan, Metin., O Sanli, Ozlem., Ozdemir, Mehmet., Baykan, Mahmut.(2014). Comparison of the performance of TK system with LJ and MGIT methods in the diagnosis of tuberculosis 2014. *Int J Clin Exp Med* ;7(4):1084-1088.

30-Fu LM and Shinnick TM. (2007). Genome-wide exploration of the drug action of capreomycin on *Mycobacterium tuberculosis* using Affymetrix oligonucleotide GeneChips. *The Journal of infection* 54, 277-284.

G

31-Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo, U, Zeller K, Andrews J and Friedland G. (2006). Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients coinfecting with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 368, 1575-1580.

32-Gèrome, Patrick., Fabre, A Michel., Soler, Charles-Pierre, Koeck., Jean-Louis., Bercion, Raymond., Le Vagueresse, Robert. (1999). Evaluation du milieu MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) pour l'étude de la sensibilité de *mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux de première ligne.

33- Gèrome, Patrick., Fabre, Michel., Koeck, Jean louis. (2003). Les méthodes d'étude de la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. *Revue française des laboratoires* n° 352.

34-Ginsberg AM and Spigelman M. (2007). Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nature medicine* 13, 290-294.

35-Gravet A, Souillard N, Habermacher J, Moser A, Lohmann C, Schmitt F, et al. (2011). Culture and susceptibility testing of mycobacterial with Versa TREK. *Pathol Biol* ;59:32—8.

36-Grosset J, Boisvert H, Truffot-Pernot C. (1990). Mycobactéries. In *Bactériologie Médicale*. Le Minor L, Veron M Ed. Paris, Flammarion.

37-Grosset J. (1995). Place des examens microbiologiques et anatomopathologiques dans la décision diagnostique et thérapeutique. *Med Mal Infect* 25: 327–33.

38-Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P and Vincent V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens* 1, e5.

H

39-Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al. (1999). Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol*; 37: 748–752.

40-Harshey RM, Ramakrishnan T. (1977). Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol*, 129, 616-22.

41-Hasan, Mehedi., Kishore, Saurab., Mst, Munshi., Banu Momi, Sabiha., Rahman, Farjana., Noor, Rashed. (2013). Evaluation of the effectiveness of BACTEC MGIT 960 for the detection of mycobacteria in Bangladesh.

42-Hegde SS, Vetting MW, Roderick S, Mitchenall LA, Maxwell A, Takiff HE, and Blanchard JS. (2005). A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 308, 1480-1483.

43-Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. (2011). Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol* 49:12024.

44-Hobby GL, Holman AP, Iseman MD and Jones J. (1973). Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob. Agents chemother.* 4:94-104

J

45-Ismail NA, Baba K, Pombo D, et al. (2009). Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from broth cultures. *Int J Tuberc Lung Dis* 13:10457.

J

46-Jabri H, Lakhdar N, El Khattabi W, Afif H. (2016). Les moyens diagnostiques de la tuberculose.

47-Jawetz E, Melnick JL, et Adelberg EA. (1968). Review of medical microbiology Blackwell Scientific. Publication. Oxford and Edinburgh. Lange medical Publication.

48-Jugheli L, Bzekalava N, Rijk P, Fissette K, Portaels F and Rigouts L. (2009). High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 5064-5068.

K

- 49-Kanchana MV, Cheke D, Natyshak I, et al.** (2000) Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for the recovery of mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37: 31–36.
- 50-Kanai K.** Introduction to Tuberculosis and Mycobacteria. *SEAMIC/IMFJ*. Tokyo. Japan 1990; 221p.
- 51-Kaufmann SH.** (2011). Fact and fiction in tuberculosis vaccine research 10 years later vol 11.
- 52-Kaufmann SH.** (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis, *Nat Rev Immunol.* 1: 20-30.
- 53-Kaufmann SH, Schaible UE,** (2005). 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus, *Trends Microbiol.* 13 (10) 469–475.
- 54-Kochi, A.** (1994). Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality. *Immunobiology* 191, 325-336.
- 55-Koch R.** (1882). Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift: Organ für practische Aertze*; 15: 221-30.
- 56-Konno K, Feldmann FM and McDermott W.** (1967). Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *The American review of respiratory disease* 95, 461-469.

L

- 57-Lee J-J, Suo J, Lin C-B , Wang J-D, Lin T-Y, Tsai Y-C.** (2003). Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria *INT J TUBERC LUNG DIS* 7(6):569–574.
- 58-Lei B, Wei CJ, and Tu SC.** (2000). Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by Mycobacterium tuberculosis KatG, isolation, and characterization of inha inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 275, 2520-2526.
- 59-Leitritz L, Schubert S, Bucherl B, et al.** (2001). Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB system for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol*; 39: 3764–3767.
- 60-Levin ME and Hatfull GF.** (1993). Mycobacterium smegmatis RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Molecular microbiology* 8,277-285.

72-Noor R, Akhter S, Rahman F, Munshi SK, Kamal SMM, Feroz F. (2012). Frequency of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) among re-treatment cases in NIDCH, Dhaka, Bangladesh, *J. Infect. Chemother.* 19 (2) 243–248.

73-Nouhouyai A, Bergogne-Berrezin E. (1996). Etude de la sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques. Techniques et indications, *Lett. Infectiol.* XI 163168.

O

74-OMS. (2015). Rapport 2015 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>(assecced 05.02.17).

75-OMS. (2016). Rapport 2016 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>(assecced 05.02.17).

76-Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y and Ochi K. (2007). Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Molecular microbiology* 63, 1096-1106.

P

77-Palaci M, Ueki S, Sato DN, Dasylya Telles MA, Curcio M, Sylva Eam. (1996). Evaluation Of Mgit For Recovery And Drug Susceptibility Testing Of *M. Tuberculosis* Isolates From Respiratory Specimens. *J Clin Microbiol* 34, 762-764.

78-Park M, Kim Y, Hwang S, et al. (2009). Evaluation Of An Immunochromatographic Assay Kit For Rapid Identification Of Mycobacterium Tuberculosis Complex In Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 47:481—4.

79-Pereira Arias-Bouda L, Nguyen L, Ho L, et al. (2000). Development Of Antigen Detection Assay For Diagnosis Of Tuberculosis Using Sputum Samples. *J Clin Microbiol*;38:2278—83.

80-Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, et al. (1997). Comparison Of The MGIT With Radiometric And Solid Culture For Recovery Of AFB. *J Clin Microbiol*, , 35, 364-368.

81-Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. (2006). Current perspectives On Drug Susceptibility Testing Of Mycobacterium tuberculosis Complex: The Automated Non-Radiometric Sys-Tems. *J Clin Microbiol*; 44:20—8

82-Programme National De Lutte Contre La Tuberculose En Algérie. (2011). Manuel de la lutte antituberculeuse a l'usage des personnels médicaux.

R

- 83-Rahman F, Munshi SK, Kamal S M M, Rahman A S M M, Rahman M M, Noor R.** (2011). Comparison Of Different Microscopic Methods With Conventional TB Culture, *S. J. Microbiol.* 1 (1) 46–50.
- 84-Reisner BS, Gatson AM, Woods GL.** (1995). Evaluation Of Mycobacteria Growth Indicator Tubes For Susceptibility Testing Of Mycobacterium Tuberculosis To Isoniazid And Rifampin, *Diagn. Microbial. Infect. Dis.* 22, 325-329.
- 85-Rist E.** (1949). *Les Symptômes De La Tuberculose Pulmonaire.* Masson, Paris, 386-389
- 86-Rivera AB, Tupasi TE, Grimaldo ER, Cardano RC et CO VM.** (1997). Rapid And Improved Recovery Rate Of *M. Tuberculosis* In Mgit With Solid Lowenstein Jensen Medium. *Tuberc Lung Dis*, 1, 454-459
- 87-Roberts GD, Goodman LN, Heifets L, Larsh H, et al .** (1983). Evaluation Of Bactec Radiometric Method For Recovery Of Mycobacteria And Drug Susceptibility Testing Of *M. Tuberculosis* From Acid Fast Smear Positive Specimens. *J Clin Microbiol*, 18, 689-696.
- 88-Romain F, Laqueyrie A, Horn C, Pescher P, Chavarot P et Marchal G.** (1996). Molécules sécrétées de BCG et de *M. tuberculosis* immunodominantes lors d'une immunisation par des bactéries vivantes .*Med.Mal.Infect*, 26:911-7.
- 89-Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR, JR, and Sacchetti JC.** (1998). Modification Of The NADH Of The Isoniazid Target (Inha) From Mycobacterium Tuberculosis. *Science* 279, 98-102.
- 90-Rusch-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, et al.** (2006). Multicenter Laboratory Validation Of The BACTEC MGIT 960 Technique For Testing Susceptibilities Of *Mycobacterium Tuberculosis* To Classical Second-Line Drugs And Newer Antimicrobials. *J Clin Microbiol*;44:688—92.
- 91-Rusch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR., Welscher HM, Pfyffer GE.** (1999). Multicenter Evaluation Of The Mycobacteria Growth Indicator Tubes For Testing Susceptibility Of Mycobacterium Tuberculosis To First-Line Drugs, *J. Clin. Microbial.* 37 45-48.
- 92-Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S and Altare F.** (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature immunology* 10, 943-948.

S

- 93-Saito H, Kashiwabara Y, Katayama T, Kwon H et Tomioka H.** (1996). Rapid Detection Of Afb With Mgit. *Kekkaku*, , 11, 399-405.

- 94-Sharma SK, Mohan A, Sharma A, Mitra DK.** (2005). Miliary Tuberculosis: New Insights Into An Old Disease. *Lancet Infect Dis*; 5(7):415 – 430.
- 95-Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE and Wang H, Zhang W and Zhang Y.** (2011). Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation In *Mycobacterium Tuberculosis*. *Science* 333, 1630-1632.
- 96-Shinnick TM, Good RC.** (1994). *Mycobacterial Taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 884-901.
- 97-Shinnick TM, Jonas V.** (1994). Molecular Approaches To The Diagnosis Of Tuberculosis. In: B. R Bloom (Ed.) *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection And Control*. Asm Press, Washington, D.C. Pp. 517-530.
- 98- Saidi L Slim, Mehiri-Zeghal E, Ghariani A, Tritar F.** (2015). Nouvelles Méthodes De Diagnostic De La Tuberculose. *Rev Pneumol Clin* ; 71:110—21.
- 99-Somoskövi A, Ködmon C, Lantos A et al.** (2000). Comparison of Recoveries of *Mycobacterium Tuberculosis* Using The Automated Bactec Mgit 960 System, The Bactec 460 Tb System, And Löwenstein-Jensen Mediu. *J. Clin. Microbiol* 38: 2395–7.
- 100-Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN and Musser JM.** (1996). Characterization of *rpsL* and *rrs* Mutations in Streptomycin-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates from Diverse Geographic Localities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 1024-1026.
- T*
- 101-Takahashi et Foster V.** (1983). Detection and Recovery of *Mycobacteria* By A Radiometric Procedure. *J Clin Microbiol* 18, 689-696.
- 102-Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR, Jr and Telenti A.** (1994). Cloning And Nucleotide Sequence Of *Mycobacterium Tuberculosis gyrA* and *gyrB* Genes And Detection Of Quinolone Resistance Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 773-780.
- 103-Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, Salazar L, Bloom BR and Jacobs WR, Jr.** (1996). Efflux Pump Of The Proton Antiporter Family Confers Lowlevel Fluoroquinolone Resistance In *Mycobacterium Smegmatis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 93, 362-366.
- 104-Taniguchi H, Chang B, Abe C, Nikaido Y, Mizuguchi Y and Yoshida SI.** (1997). Molecular Analysis of Kanamycin And Viomycin Resistance In *Mycobacterium Smegmatis* By Use Of The Conjugation System. *Journal Of Bacteriology* 179, 4795-4801.

105-Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G and Nista D. (1999). Use Of Bactec Mgit For Recovery Of Mycobacteria From Clinical Specimens: Multicenter Study. J. Clin. Microbiol. **37**:3578–3582.

106-Tortoli, Enrico., Benedetti, Marta., Fontanelli, Alessandra., Simonetti, M Tullia. (2001). Evaluation Of Automated Bactec Mgit 960 System For Testing Susceptibility Of *Mycobacterium Tuberculosis* To Four Major Antituberculous Drugs: Comparison With The Radiometric Bactec 460tb Method And The Agar Plate Method Of Proportion, Journal Of Clinical Microbiology, P. 607–610

107-Truffot-Pernot C, Veziris N. (2001). Les tests bactériologiques de la tuberculose maladie : standards et perspectives. Revues des maladies respiratoires 28, 1034-1047.

W

108-Walters, Shaun B and Hanna, Bruce A. (1996). Testing of Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and Rifampin by Mycobacterium Growth Indicator Tube Method. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, June 1996, p. 1565–1567.

109-Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee H I, et al. (2000). Comparison of the BACTEC MGIT 960 asd ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 38: 4167– 4170.

110-Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, Wolbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rusch-Gerdes S, Locht C, Brisse S, et al. (2008). Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. PLoS pathogens 4, e1000160.

111-World Health Organisation. (2008). Policy guidance on drug susceptibility testing of second-line antituberculous drugs. Geneva: WHO.

Y

112-Yala D, Tazir M. (mars 2009). Diagnostic bactériologique de la tuberculose et des mycobactéries, Institut PASTEUR d'Algérie laboratoire centrale de la tuberculose.

113-Yan JJ, Huang AH, Tsai SH, et al. (2000). Comparison of the MB/Bac T and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 37: 25–30.

Z

114-Zanetti S, Ardito F, Sechi L et al. (1997). Evaluation of a non-radiometric system (Bactec 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical sample. *J. Clin. Microbiol* 35: 2072–5.

115-Zapata Pablo, Arbeloa Miguel and Axnar Javiev. (1999). Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from clinical specimens *Clin Microbiol Infect* 5: 337-330.

116-Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D and Cole S. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 358, 591-593.

117-Zhang Y and Jacobs Jr, W.R., Jr. (2008). Mechanisms of Drug Action, Drug Resistance and Drug Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*: Expected Phenotypes from Evolutionary Pressures from a Highly Successful Pathogen. In *Handbook of Tuberculosis: Molecular Biology and Biochemistry*. Stefan H.E. Kaufmann and Eric Rubin (editors).

ANNEXES

Annexes 1

1- La fuchsine de ziehl :

Fuschine basique.....	10 g
Alcool à 95°.....	100 ml
Phénol aqueux.....	55 ml
Eau distillée	1000 ml

2- Le bleu de méthylène :

Bleu de méthylène.....	20 g
Phénol aqueux.....	22 ml
Alcool à 95 °.....	100 ml
Eau distillée	1000 ml

3- Le milieu de culture Lowenstein-Jensen :

Composition :

Œufs entiers.....	625 cm ³
Asparagine	2, 25 g
Fécule de pomme de terre.....	18,75 g
Glycérol	7,5 cm ³
Citrate de magnésium	0, 375 g
Vert de malachite	0.25 g
Sulfate de magnésium	0,15 g
Dihydrogénophosphate de potassium...1, 5 g	
Eau distillée	1000 ml

4- Le milieu *MGIT* :

Le tube avec indicateur de croissance mycobactérienne *BBL MGIT* contient : 110 µL d'un indicateur fluorescent et 7 mL de bouillon. L'indicateur contient du chlorure de tris 4,7-diphényl-1, 10-phénanthroline ruthénium pentahydraté dans une base de caoutchouc à silicone. Les tubes sont gazés avec 10 % de CO₂ et fermés avec des capuchons en polypropylène.

Formule approximative pour 1L d'eau purifiée :

Bouillon de base Middlebrook 7H9 modifié.....	5,9 g
Peptone de caséine	1,25 g

Le supplément de croissance *BACTEC MGIT* contient 15ml de supplément d'enrichissement Middlebrook *OADC*.

Formule approximative pour 1L d'eau purifiée :

Albumine bovine.....	50,0 g	Catalase	0,03 g
Dextrose	20,0 g	Acide oléique	0,1 g
Stéarate de polyoxyéthylène (POES).....	1,1 g		

L'ampoule de *BBL MGIT PANTA* contient un mélange lyophilisé d'agents antimicrobiens.

Formule approximative par ampoule lyophilisée *PANTA* :

Polymexine B	6, 000 unités
Amphotéricine B	600 µg
Acide Nalidixique	2,400 µg
Triméthoprime	600 µg
Azlocilline	600 µg

Réactifs *BBL MycoPrep* :

Formule approximative par litre d'eau purifié :

NaOH.....	20,0g
Citrate trisodique ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	14,5g

Chaque ampoule de verre scellée à l'intérieur du flacon contient au minimum 0,370g de NALC ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$)

Tampon phosphate *BBL MycoPrep* :

Formule approximative pour 500 ml d'eau distillée :

Phosphate disodique (Na_2HPO_4).....	2,37g
Phosphate mono potassique (KH_2PO_4).....	2, 27g

pH final 6,8

Conservation des réactifs : tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne *BBL MGIT*
Dès réception, conservé entre 2-25°C. Ne pas congeler. Minimiser l'exposition à la lumière.
Le bouillon doit être clair et incolore. Ne pas l'utiliser s'il est turbide. Les tubes *MGIT*

conservés dans les conditions décrites sur l'étiquette jusqu'au moment de l'utilisation peuvent être inoculés jusqu'à la date de péremption et incubés jusqu'à huit semaines.

Supplément de croissance *BACTEC MGIT* dès réception, conservé à l'obscurité entre 2-8°C. Ne pas l'ouvrir avant d'être prêt à l'utilisation.

Complexe d'antibiotiques *BBL MGIT PANTA* Dès réception, conservé les ampoules lyophilisées entre 2-8°C. Une fois reconstitué, le mélange *PANTA* doit être conservé entre 2-8°C et utilisé dans les 5 jours.

5- La trousse *BACTEC MGIT 960 SIRE* :

La trousse *BACTEC MGIT 960 SIRE* contient un flacon de streptomycine, d'isoniazide, de rifampicine et d'ethambutol lyophilisés, respectivement, et huit flacons de supplément *SIRE*

Formule approximative de par flacon d'antibiotique lyophilisé : Streptomycine332µg

Formule approximative de par flacon d'antibiotique lyophilisé : Isoniazide33,2µg

Formule approximative de par flacon d'antibiotique lyophilisé : Rifampicine 332µg

Formule approximative de par flacon d'antibiotique lyophilisé : Ethambutol1660µg

Le supplément *BACTEC MGIT 960 SIRE* contient 20 ml de supplément d'enrichissement Middlebrook OADC

Formule approximative par litre d'eau distillée

Albumine bovine.....50, 0g

Dextrose.....20,0g

Catalase.....0,03g

Acide oléique.....0, 6g

Annexe 2

INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Laboratoire Central de la Tuberculose

Oued Kniss.

FICHE DE RENSEIGNEMENTS**STRUCTURE**

Hôpital ou CCTMR.....N° de dossier.....

Service.....Médecin.....

MALADE

Nom.....Age.....

Prénom.....Sexe.....

Adresse.....

Adresse Professionnelle

MALADIE

- Début de la maladie remonte:.....

- Malade a été déjà traité par les antituberculeux avant l'épisode actuel
(Ancien malade) : Oui /_/ Non /_/

- Si oui quand a-t-il reçu son premier traitement ?

- Antibiotiques reçus:.....

- Durée des antibiotiques reçus:.....

- Localisation de la tuberculose

a/ Pulmonaire /_/

b/ Extra-Pulmonaire /_/

Si oui : quel est la localisation

PRELEVEMENT:

Nature :.....Date de Réception:.....

RESULTATS BACTERIOLOGIQUES:

Microscopie :.....

Culture N°:.....Nombre de col.....partube (s) de L. J.

Date d'envoi de la culture au laboratoire de la Tuberculose et des Mycobactéries

.....

Annexe 3

INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Laboratoire Central de la Tuberculose

Oued Kniss.

N°.....

Nom : **Prénom :**

Nature du prélèvement : Date de réception :

1^{er} RDV.....2eme RDV.....3eme RDV.....

Annexe4

N°	SM	INH	RIF	EMB	SM	INH	RIF	EMB	KM	OFX
1	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
2	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
3	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
4	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
5	S	R	S	S	/	/	/	/	/	/
6	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
7	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
8	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
9	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
10	S	S	R	S	S	S	S	S	/	/
11	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
12	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
13	S	R	S	S	S	S	S	S	/	/
14	S	S	S	S	S	R	S	S	/	/
15	R	R	R	S	/	/	/	/	/	/
16	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
17	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
18	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
19	S	R	S	S	S	S	S	S	/	/
20	/	/	/	/	R	R	R	S	S	S
21	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
22	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
23	R	R	R	R	S	R	R	S	/	/
24	S	S	S	S	S	R	R	S	/	/
25	R	R	R	S	S	S	S	S	/	/
26	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
27	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
28	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
29	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
30	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
31	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
32	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
33	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
34	R	S	S	S	S	S	S	S	/	/
35	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
36	R	S	S	S	S	S	S	S	/	/
37	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
38	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
39	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
40	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
41	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
42	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
43	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/

44	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
45	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
46	R	R	R	S	/	/	/	/	/	/
47	S	S	S	S	S	R	R	S	/	/
48	R	R	S	R	/	/	/	/	/	/
49	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
50	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
51	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
52	/	/	/	/	R	S	S	S	/	/
53	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
54	R	S	S	S	/	/	/	/	/	/
55	/	/	/	/	R	S	S	S	/	/
56	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
57	/	/	/	/	R	S	S	S	/	/
58	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
59	/	/	/	/	S	R	S	S	/	/
60	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
61	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
62	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
63	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
64	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
65	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
66	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
67	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
68	S	R	S	S	S	R	S	S	/	/
69	S	R	R	S	/	/	/	/	/	/
70	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
71	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
72	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
73	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
74	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
76	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
77	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
78	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
79	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
80	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
81	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
82	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
83	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
84	R	R	S	R	R	R	S	S	/	/
85	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
86	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
87	S	R	S	S	S	S	S	S	/	/
88	S	S	R	S	/	/	/	/	/	/
89	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/

90	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
91	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
92	S	R	R	S	S	S	S	S	/	/
93	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
94	S	R	S	S	S	S	S	S	/	/
95	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
96	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
97	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
98	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
99	R	R	S	R	S	S	S	S	/	/
100	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
101	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
102	/	/	/	/	R	S	S	S	/	/
103	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
104	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
105	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
106	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
107	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
108	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
109	S	R	S	S	/	/	/	/	/	/
110	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
111	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
112	S	S	S	S	R	S	S	S	/	/
113	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
114	R	R	R	S	R	R	R	S	/	/
115	R	R	S	R	/	/	/	/	/	/
116	R	R	S	R	/	/	/	/	/	/
117	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
118	R	S	S	S	S	S	S	S	/	/
119	S	R	R	S	S	S	S	S	/	/
120	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
121	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
122	/	/	/	/	S	S	S	S	S	S
123	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
124	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
125	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
126	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
127	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
128	R	R	S	S	/	/	/	/	/	/
129	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
130	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
131	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
132	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
133	/	/	/	/	R	R	R	R	/	/
134	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
135	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/

136	R	S	S	S	/	/	/	/	/	/
137	S	R	S	S	S	R	S	S	/	/
138	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
139	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
140	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
141	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
142	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
143	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
144	S	S	S	S	S	S	S	S	/	/
145	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
146	R	R	R	R	/	/	/	/	/	/
147	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
148	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/
149	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
150	/	/	/	/	R	R	R	R	R	R
151	S	R	S	S	S	S	S	S	/	/
152	R	R	S	S	/	/	/	/	/	/
153	R	S	S	S	S	S	S	S	/	/
154	R	S	S	S	/	/	/	/	/	/
155	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
156	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/
157	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/

Annexe 5

BACTEC MGIT 960

Rapport des tubes AST déchargés

Numéro Instrument	Date/ heure actuelle	Température			Version logiciel	Numéro Page
		A	B	C		
1	10/04/17 11 :13	36,7°C	36°C	36,6°C	V5.02A	2

N° de sèquence: 39550110697 TDP : 12;5 DP :28/03/17 16:11 Date décharge: 10/04/17

POSITION Unitè

TUBE	Croissance	Etat	Concentration	Antibiotique
C/R06	400	C		Growth Control
C/R07	400	R	1,00 µg/ml	Streptomycin
C/R08	0	S	0,10µg/ml	Isoniazid
C/R09	0	S	1,00µg/ml	Rifampicin
C/R10	0	S	5,00µg/ml	Ethambutol

Résumé :

Dans une perspective de comparaison entre le système classique et le système automatisée *BACTEC MGIT 960* dans le diagnostic et l'antibiogramme, cette étude a été réalisée au niveau de l'IPA, durant une période de 16 mois.

Neuf cent quatorze prélèvements ont été recueillis, et 179 souches BK isolées par les deux méthodes utilisées, *MGIT* a isolé 155 et le L-J 123. L'analyse statistique confirme que le *MGIT* est plus sensible ($P=0.037$) que le L-J. Le temps de détection moyen de *M. tuberculosis* est de 7 jours pour le *MGIT* et de 28 jours pour le L-J.

157 souches ont subi l'antibiogramme par les deux techniques citées, seul 83 cas ont été des résultats interprétables par les deux méthodes en même temps. À l'exception de l'isoniazide l'analyse statistique par le test *Khi2* ($P= 0.064$) n'a pas montré une différence statistiquement significative par ces deux méthodes. Sur les 157 souches, 16 étaient des MDR dont un cas XDR-TB.

Pour cela une combinaison des deux méthodes liquide et solide est recommandée afin d'améliorer le rendement.

Mots clé: *Mycobacterium tuberculosis*, *BACTEC MGIT 960*, Loweinsten-jensen, Antibiogramme, diagnostic.

Abstract:

From the prospect of comparison between the traditional system and system automated *BACTEC MGIT 960* on the diagnosis and the susceptibility testing, this study was realized on the level of the IPA, during 16 month.

Nine hundred and fourteen sputum were collected, and 179 strains of BK were isolated by the two methods used, *MGIT* detected 155 isolates followed by L-J with 123 isolates. The statistical analysis confirms that *the MGIT* is more sensitive ($P=0.037$) than L-J. The mean time to detect *M. tuberculosis* was 7 days with *MGIT 960*, 28 days with L-J.

157 strains underwent the susceptibility testing by the two techniques, only 83 cases gives interpretable results by the two methods at the same time. Except with Isoniazid, the statistical analysis by the test *Khi 2* ($P = 0.064$) did not show a statistically significant difference by these two methods. On the 157 strains, 16 was MDR of which a case XDR-TB.

Keys words: *Mycobacterium tuberculosis*, *BACTEC MGIT 960*, Loweinsten-jensen, susceptibility testing, diagnostic.