

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**THESE Présentée par**  
**M<sup>lle</sup> GUENAOUI Kheira**  
**EN VUE DE L'OBTENTION**  
**DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES**  
**SPECIALITE : SCIENCES BIOLOGIQUES**  
**Option : Biologie moléculaire et immunologie.**

**Thème**

**Diagnostic moléculaire et recherche des gènes de  
résistance des souches de la tuberculose isolées dans la  
région de l'Ouest Algérien**

**Soutenu le**

**Devant le Jury composé de :**

**Président :**

Mr. ABBOUNI Bouziane (Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbés)

**Examineurs :**

Mr. BELABID Lakhdar (Professeur à l'Université de Mascara)

Mr. BACHIR RAHOU Ghalem (Maitre de conférences à l'Université de Mascara)

**Directeur de thèse :**

Mme HARIR Noria (MCA à l'Université de Sidi Bel Abbés)

**Année universitaire 2015/2016**

## ***REMERCIEMENTS***

*Tout d'abord, mes remerciements les plu sincères s'adressent à ALLAH qui m'a donné la force et le courage pour réaliser ce travail.*

*Je remercie le **Dr. HARIR Noria** d'avoir dirigé ce travail. Merci de la confiance et de la liberté que vous avez su m'accorder et pour tout ce que vous m'avez appris. Un merci spécial pour ses conseils, son précieux soutien moral pendant les périodes difficiles et ses encouragements.*

*J'exprime ma reconnaissance aux membres de jury : **Pr. ABBOUNI Bouziane, Pr. BELABID Lakhdar et Dr. BACHIR RAHOU Ghalem** , qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail malgré leurs nombreuses charges.*

*Je remercie particulièrement le **Dr BENABDERRAHMENE Mokhtar** qui a su me guider vers une réflexion plus critique et plus éclairée de la science et de la vie en général.*

*Mes remerciements les plus vifs s'étendent au personnel du service de pneumo-phtisiologie point B de CHU d'Oran, ainsi que de laboratoires d'analyses médicales de Sig pour leurs aides et leurs gentillesse, qu'ils trouvent ici la marque de mon respect et de ma gratitude.*

*Je remercie chaleureusement toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces années et avec qui j'ai pu échanger de science ou de toutes autres choses. Merci grandement à tous ce qui, par leurs qualités humaines, leur gentillesse, leur bonne humeur et leur efficacité, ont rendu le quotidien tellement plus agréable.*

*Enfin, un grand merci à tous mes amis et ma famille. Merci à toi ma tante **AICHA** pour l'éducation que tu m'as offerte et les valeurs que tu m'as transmises, merci d'avoir toujours été présente et d'avoir toujours fait pour le mieux, merci à mon très cher frère **SIDAHMED** pour la beauté, la générosité de son don.*

**RESUME**

La tuberculose multirésistante (TB-MDR) est définie par la perte de sensibilité des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* aux deux majeurs antituberculeux: l'isoniazide (H) et la rifampicine (R). L'objectif de notre étude était de décrire le profil épidémiologique, clinique, bactériologique, et évolutif des tuberculeux multirésistants dans la région de l'Ouest Algérien. Trente-six patients étaient colligés. L'âge moyen était de 33,7 ans. Les facteurs de risque de TB-MDR soulignés dans notre série étaient : le tabac ( $n=12$  ; 33,3%), l'alcoolisme ( $n=1$  ; 2,8%), les antécédents familiaux de TB-MDR ( $n=3$  ; 8,33%), le diabète ( $n=1$ ) et HIV=1 équivalait à 2,8% pour chacun. La TB-MDR primaire a été retrouvée dans 11,11 % des cas, tandis que la secondaire dans 88,89% des cas. Il s'agissait d'une résistance à l'H et R dans 13,8 % des cas ( $n=5$ ) ; à l'H, R et streptomycine (S) dans 50 % des cas ( $n=18$ ) ; à l'H, R et éthambutol (E) dans 5,6 % des cas ( $n=2$ ). Le pourcentage des patients qui avaient perdu la sensibilité du bacille aux quatre antituberculeux de première ligne (H, R, S et E) était de 25 % de l'ensemble des malades testés ( $n=9$ ) et l'H, R, S, et ofloxacine (O) dans 2,8 % des cas ( $n=1$ ). Un patient présentait une TB ultra-résistante (XDR) soit 2,8 %. La guérison a été déclarée dans 10 cas, 5 malades étaient décédés, 17 étaient en cours de traitement et une abondance de traitement a été notée pour 4 cas.

L'émergence des souches multirésistantes de la tuberculose est l'une des préoccupations majeures de la politique de la santé et le diagnostic rapide ainsi que la détection de la résistance à la rifampicine chez les patients infectés sont essentiels pour la gestion de la maladie. De ce fait, les échantillons d'expectorations de patients forts suspects de tuberculose multirésistante ont été soumis à examen microscopique de frottis, la culture, les méthodes classiques de détection de résistance suivie par test GeneXpert MTB / RIF. Sur un total de 50 cas inclus dans cette étude, MTB a été détectée chez tous les patients (100%) par GeneXpert MTB / RIF. Cependant, la résistance du RIF a été détecté dans seulement 21 cas (42%) par GeneXpert MTB / RIF. Toutes les souches résistantes à la rifampicine détectées par GeneXpert MTB / RIF ont été confirmées comme phénotypiquement souches multirésistantes. 42,85 % des cas étaient des cas d'échec de retraitement, les cas de retraitement frottis positif à 4 mois étaient 23,82 %. Alors que 19,05% des cas étaient des cas de retraitement frottis positif au moment du diagnostic, et 14,28% des patients avaient des antécédents de contact avec la TB-MDR. La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative de Xpert MTB / RIF pour détecter la résistance RIF

par rapport à la technique classique de sensibilité phénotypique de la drogue ont été trouvés égaux aux taux de 100, 100, 100 et 100 %, respectivement.

Le taux de résistance primaire trouvé dans cette étude constitue une menace pour les efforts de contrôle de la tuberculose MDR en Algérie, Il est donc important d'actualiser les résultats et d'évaluer l'ampleur du problème. GeneXpert MTB / RIF test est une technique efficace et fiable pour le diagnostic rapide de la tuberculose.

**Mots clés:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose multirésistante, résistance à la rifampicine, GeneXpert MTB/RIF.

**ABSTRACT**

Multidrug-resistant TB (MDR-TB) is defined as the loss of sensitivity of strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex to the two major tuberculosis drugs: isoniazid (H) and rifampicin (R). The aim of our study was to describe the epidemiological, clinical, bacteriological profile, and progressive multi-resistant tuberculosis in the western region of Algeria. Thirty- six patients were collected. The medium age was 33.7 years. MDR-TB risk factors outlined in our series were: smoking (n = 12; 33.3%) , alcoholism (n = 1 , 2.8 % ) , family history of MDR-TB (n = 3; 8.33% ) , diabetes ( n = 1) and HIV = 1 is equivalent to 2.8% for each. Primary MDR-TB was found in 11.11% of cases, while second in 88.89 % of cases. This was a resistance to H and R in 13.8% of cases (n = 5); to H, R and streptomycin (S) in 50% of cases (n = 18); to H, R, and ethambutol (E) in 5.6% of cases (n = 2).

The percentage of patients who lost the bacillus sensitivity to four first line TB drugs (H, R, S and E) was 25% of all patients tested ( n = 9) and H , R, S , and ofloxacin (O) in 2.8% of cases (n = 1). One patient had an ultra- resistant TB (XDR) or 2.8%. Healing was reported in 10 cases, 5 patients had died, 17 were being processed and an abundance of treatment was noted in 4 cases. The emergence of multidrug-resistant strains of TB is a major concern of the health policy and the rapid diagnosis and detection of rifampicin resistance in infected patients is essential for managing the disease. Therefore, samples of sputum strong MDR-TB patients suspects were subjected to smear microscopy, culture, traditional methods of resistance detection test followed by GeneXpert MTB / RIF. Of a total of 50 cases included in the study, MTB was detected in all patients (100%) by GeneXpert MTB / RIF. However, RIF resistance was detected in only 21 cases (42%) by GeneXpert MTB / RIF. All strains resistant to rifampicin detected by GeneXpert MTB / RIF have been confirmed phenotypically as multidrug resistant strains. 42.85 % were cases of retreatment failure cases of retreatment smear positive 4 months was 23.82%. While 19.05% of the cases were smear positive retreatment at diagnosis, and 14.28% of patients had a history of contact with MDR-TB. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of Xpert MTB / RIF for detecting RIF resistance compared with the conventional technique of phenotypic susceptibility of the drug were found equal to the rate of 100, 100, 100 and 100%, respectively.

The primary resistance rates found in this study is a threat to the MDR TB control efforts in Algeria, it is important to update the results and assess the extent of the problem. GeneXpert MTB / RIF test is an efficient and reliable technique for rapid diagnosis of tuberculosis.

***Key words:*** *Mycobacterium tuberculosis*, Multidrug-resistant tuberculosis, rifampicin resistance, GeneXpert MTB / RIF.

## ملخص

يتم تعريف للأدوية المتعددة مقاومة السل (MDR -TB) مثل فقدان حساسية من سلالات المتفطرة السلية المعقدة مع اثنين من السل رئيسية هي: بالأيزونيازيد (H) و ريفامبيسين (R) . وكان الهدف من دراستنا لوصف السل متعدد المقاومة البائية والسريرية ، البكتريولوجي ، وقابلة لل في المنطقة الغربية من الجزائر . تم جمع ستة وثلاثين مريضا . وكان متوسط العمر 33.7 عاما

وكانت عوامل الخطر للسل المقاوم للأدوية المتعددة الواردة في هذه السلسلة : التدخين (ن = 12؛ 33.3 % ) ، وإدمان الكحول (ن = 1 ، 2.8 % ) ، والتاريخ العائلي ل مرض السل المقاوم للأدوية المتعددة (ن = 3؛ 8.33 % ) ، مرض السكري (ن = 1) و فيروس نقص المناعة البشرية = 1 ما يعادل 2.8 % لكل منهما . تم العثور على MDR -TB الرئيسي في 11.11 % من الحالات ، في حين أن الثانية في 88.89 % من الحالات. وكانت هذه المقاومة إلى H والبحث في 13.8 % من الحالات (ن = 5)؛ ل ه، (R S) و الستربتومايسين في 50 % من الحالات (ن = 18)؛ إلى H ، R ، و الإيثامبوتول (E) في 5.6 % من الحالات (ن = 2)

وكانت النسبة المئوية للمرضى الذين فقدوا الحساسية عصبية على أربعة أدوية الخط السل الأولى (H ، R ، S و E) 25 % من جميع المرضى اختبار (ن = 9) و H ، R ، S و أوفلوكساسين (O) في 2.8 % من الحالات (ن = 1) . كان مريض واحد من السل مقاومة لل غاية (XDR) أو 2.8 % . وذكر الشفاء في 10 حالات ، و 5 مرضى ماتوا ، 17 و يتم معالجتها و لوحظ وفرة من العلاج في 4 حالات

ظهور سلالات مقاومة للعقاقير من مرض السل هو مصدر قلق كبير للسياسة الصحية و التشخيص السريع و الكشف عن مقاومة ريفامبيسين في المرضى المصابين أساسا لإدارة المرض . لذلك ، تعرض عينات من البلغم قوي المشتبه فيهم مرضى السل المقاوم للأدوية المتعددة لتشويه المجهر ، والثقافة، و الطرق التقليدية في اختبار الكشف عن مقاومة تليها

## GeneXpert MTB / RIF

ما مجموعه 50 حالة شملتها الدراسة، تم الكشف عن MTB في جميع المرضى (100%) من خلال GeneXpert MTB / RIF . ومع ذلك، تم الكشف عن المقاومة RIF إلا في 21 حالة (42%) من GeneXpert MTB / RIF . وقد أكد جميع سلالات مقاومة للريفامبيسين الكشف عنها بواسطة GeneXpert MTB / RIF ظاهريا كما أدوية المتعددة السلالات المقاومة. كانت 42.85% حالة من حالات فشل إعادة معالجة من إعادة تشويه 4 أشهر إيجابية كان 23.82%. في حين أن 19.05% من حالات تشويه إعادة معالجة الإيجابية في التشخيص، وكان 14.28% من المرضى تاريخ من الاتصال مع MDR-TB. تم العثور على الحساسية والنوعية والقيمة التنبؤية الإيجابية والقيمة التنبؤية السلبية للكسبيرت MTB / RIF للكشف عن المقاومة RIF مقارنة مع تقنية التقليدية قابلية المظهري من المخدرات مساويا لمعدل 100، 100، 100 و 100%، على التوالي.

أسعار المقاومة الأولية وجدت في هذه الدراسة تشكل تهديدا ل جهود مكافحة السل المقاوم للأدوية في الجزائر ، فمن المهم لتحديث نتائج وتقييم حجم المشكلة . GeneXpert MTB / RIF الاختبار هو تقنية فعالة وموثوق بها للتشخيص السريع لمرض السل

كلمات البحث: المتفطرة السلية ، السل المقاوم للأدوية ، ومقاومة ريفامبيسين ، GeneXpert MTB / RIF .

# TABLE DES MATIERES

Remerciements

Résumé

Abstract

Résumé en arabe

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 01

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE La tuberculose : un problème de santé publique

I-Pathogénèse et évolution de la maladie ..... 03

I-1-Agent causal..... 03

I-2-La maladie..... 07

    I-2-1-Transmission..... 07

    I-2-2-Primo-infection..... 08

    I-2-3-Tuberculose active..... 09

II-Diagnostic et dépistage de la tuberculose..... 10

II-1- Dépistage de la tuberculose latente (primo-infection)..... 10

    II-1-1- IDR : l'intradermo-réaction à la tuberculine (test de Mantoux)..... 11

II-2- Diagnostic de la tuberculose maladie..... 12

    II-2-1- L'examen radiologique..... 12

    II-2-2- Confirmation du diagnostic : l'examen bactériologique..... 12

III- Traitement de la tuberculose ..... 15



<b>III-1-Histoire du traitement antituberculeux.....</b>	<b>15</b>
<b>III-2-Moyens de lutte .....</b>	<b>17</b>
<b>III-2-1 Moyens préventifs.....</b>	<b>17</b>
<b>III-2-2- Moyens de traitement.....</b>	<b>18</b>
<b>III-3-Régime de traitement antituberculeux.....</b>	<b>19</b>
<b>III-3-1- Médicaments anti-tuberculeux de première ligne.....</b>	<b>19</b>
<b>III-3-2-Médicaments anti-tuberculeux de deuxième ligne.....</b>	<b>22</b>
<b>IV- Tuberculose à germes résistants aux antibiotiques antituberculeux : généralités et mécanismes de résistance.....</b>	<b>24</b>
<b>IV-1-Histoire de la résistance aux antituberculeux.....</b>	<b>24</b>
<b>IV-2- Généralités.....</b>	<b>24</b>
<b>IV-2-1- Définition de la résistance bactérienne à un antibiotique.....</b>	<b>24</b>
<b>IV-2-2-Résistance de <i>M.tuberculosis</i> aux antibiotiques antituberculeux.....</b>	<b>24</b>
<b>IV-3- Mécanismes de résistance aux antituberculeux .....</b>	<b>27</b>
<b>IV-3-1- Mécanismes de résistance aux antibiotiques de première ligne.....</b>	<b>27</b>
<b>IV-3-2-Mécanismes de résistance aux antibiotiques de deuxième ligne.....</b>	<b>30</b>
<b>IV-4- Détection des résistances aux antituberculeux de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</b>	<b>30</b>
<b>IV-4-1- Méthodes phénotypiques: l'antibiogramme.....</b>	<b>30</b>
<b>IV-4-2- Méthodes moléculaires .....</b>	<b>32</b>
<b>V- Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux.....</b>	<b>36</b>
<b>V-1- La tuberculose et la résistance aux antituberculeux dans le monde.....</b>	<b>36</b>
<b>V-2- La tuberculose et la résistance aux antituberculeux en Algérie.....</b>	<b>40</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
<b>I-Objectifs.....</b>	<b>43</b>
<b>II-Matériels et Méthodes.....</b>	<b>43</b>

<b>II-1- Partie épidémiologique.....</b>	<b>43</b>
<b>II- 1-1-Type et durée de l'étude.....</b>	<b>43</b>
<b>II-1-2-Population étudiée.....</b>	<b>43</b>
<b>II-1-3- Critères d'inclusion.....</b>	<b>44</b>
<b>II-1-4- Paramètres analysés.....</b>	<b>44</b>
<b>II-2-Partie moléculaire.....</b>	<b>44</b>
<b>II- 2-1-Type et durée de l'étude.....</b>	<b>44</b>
<b>II-2-2-Population étudiée.....</b>	<b>44</b>
<b>II-2-4- Examen de frottis : Coloration de Ziehl-Neelsen-protocole expérimentale.....</b>	<b>44</b>
<b>II-2-5- La mise en culture.....</b>	<b>45</b>
<b>II-2-6-Les tests de sensibilité.....</b>	<b>46</b>
<b>II-2-7-Test de dépistage rapide de la résistance à la rifampicine : technique GeneXpert MTB/RIF .....</b>	<b>46</b>
<b>III-RESULTATS.....</b>	<b>49</b>
<b>IV-DICUSSION.....</b>	<b>57</b>
<b>V-CONCLUSION.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>67</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
AMK	:	Amikacine
BAAR	:	BacilleAcido-Alcool-Résistant.
BK	:	Bacille de K
BCG	:	Bacille de Calmette et Guérin
CFX	:	Ciprofloxacine
CMI	:	Concentration Minimale Inibitrice
CPM	:	Capreomycine
DOTS	:	Directly Observed Treatment, Short-course
EMB	:	Éthambutol
ESAT-6	:	Early Secretory Antigenic Target 6
FIND	:	Fondation pour les Nouveaux Diagnostics Innovateurs
FQ	:	Fluoroquinolones
G + C	:	Guanine + Cytosine
IDR	:	Intradermo-réaction
INH	:	Isoniazide
ITL	:	Infection tuberculeuse latente
KM	:	Kanamycine
LJ	:	Lowenstein-Jensen
MNT	:	Mycobactéries Non Tuberculeuses
MOTT	:	Mycobacteria Other Than Tuberculosis
OADC	:	Acide oléique, albumine, dextrose et catalase
OFX	:	Ofloxacine
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PAS	:	Acide para-aminosalicylique
pd	:	Paires de bases
PCR	:	Polymérase Chain Réaction
PPD	:	Purified Protein Derivative
PZA	:	Pyrazinamide
QRD	:	Quinolones Resistance Determinant
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGM	:	Rapid Growth Mycobacteria

RIF : Rifampicine  
SFX : Sparfloxacine  
SM : Streptomycine ;  
STAG-TB : Strategic and Technical Advisory Group for TB  
TCH : Acide thiophène-2-carboxylique  
VIH : Virus d'Immuno-déficience Humaine

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Taxinomie des mycobactéries.....	<b>04</b>
<b>Figure 2 :</b>	Image de <i>M. tuberculosis</i> par microscopie électronique à balayage (21228x).....	<b>06</b>
<b>Figure 3 :</b>	Représentation schématique du génome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	<b>07</b>
<b>Figure 4 :</b>	Intradermoréaction à la tuberculine.....	<b>11</b>
<b>Figure 5 :</b>	Observation microscopique des BAAR: (A) coloration à l'Auramine et (B) coloration de Ziehl-Nelsen.....	<b>13</b>
<b>Figure 6 :</b>	Aspect des colonies sur milieu de culture solide.....	<b>13</b>
<b>Figure 7 :</b>	Représentation schématique de l'évolution du traitement de la tuberculose (et de sa durée) au cours du temps.....	<b>16</b>
<b>Figure 8 :</b>	Structure de l'isoniazide (INH).....	<b>20</b>
<b>Figure 9:</b>	Structure de la rifampicine (RIF).....	<b>20</b>
<b>Figure 10:</b>	Structure de la pyrazinamide (PZA).....	<b>21</b>
<b>Figure 11:</b>	Structure de l'éthambutol (EMB).....	<b>22</b>
<b>Figure 12 :</b>	Structure de l'acide p-aminosalicylique.....	<b>22</b>
<b>Figure 13 :</b>	Structure de l'éthionamide (ETH, 2-éthylthioisonicotinamide).....	<b>23</b>
<b>Figure 14 :</b>	Structure de la paroi des mycobactéries.....	<b>25</b>
<b>Figure 15 :</b>	L'antibiogramme par méthode des proportions.....	<b>31</b>
<b>Figure 16 :</b>	Bandelette GenoType MTBDR plus et GenoType MTBDRsl .....	<b>33</b>
<b>Figure 17 :</b>	Méthode du test Xpert MTB/RIF.....	<b>34</b>
<b>Figure 18 :</b>	Schéma représentatif de la séquence alignée du gène <i>rpoB</i> (RIF Resistance Determining Region).....	<b>35</b>
<b>Figure 19 :</b>	Taux d'incidence de la tuberculose dans le monde en 2014.....	<b>37</b>
<b>Figure 20 :</b>	Prévalence de la TB-MDR parmi les nouveaux cas et les cas déjà traités de tuberculose dans le monde en 2014.....	<b>38</b>
<b>Figure 21 :</b>	La tuberculose en Afrique en 2014. ....	<b>39</b>
<b>Figure 22 :</b>	Incidence de la tuberculose en Algérie de 1962 à 2008.....	<b>40</b>

<b>Figure 23:</b>	La tuberculose en Algérie en 2014. ....	<b>42</b>
<b>Figure 24 :</b>	Les étapes de traitements des prélèvements pour recherche de BK.....	<b>46</b>
<b>Figure 25:</b>	Les étapes du test Xpert MTB/RIF.....	<b>47</b>
<b>Figure 26:</b>	Répartition des cas de tuberculose <i>MDR</i> selon l'année et le sexe.....	<b>49</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b>	Classification des mycobactéries atypiques selon Runyon.....	5
<b>Tableau 2:</b>	Gènes de résistance des bactéries du complexe <i>M. tuberculosis</i> et principales mutations identifiées.....	29
<b>Tableau 3:</b>	Prévalence de la résistance primaire au cours de deux enquêtes nationales prospectives.....	41
<b>Tableau 4:</b>	Caractéristiques sociodémographiques et cliniques des cas de TB-MDR.....	51
<b>Tableau 5:</b>	Résultats des antibiogrammes.....	52
<b>Tableau 6:</b>	Distribution des cas selon les problèmes du retraitement.....	52
<b>Tableau 7:</b>	Issue du traitement de la tuberculose multirésistante.....	53
<b>Tableau 8:</b>	Caractéristiques Sociodémographiques des patients.....	54
<b>Tableau 9:</b>	Comparaison du test Gene Xpert avec Zn frottis et les résultats de la culture LJ.....	55
<b>Tableau 10:</b>	Comparaison des résultats de GeneXpert par rapport à la culture LJ.....	55
<b>Tableau 11:</b>	Répartition des cas par la résistance à la rifampicine.....	55
<b>Tableau 12:</b>	Répartition des cas de résistance Rifampicine selon la catégorie des patients.....	56
	...	
<b>Tableau 13:</b>	Prévalence de tuberculose multirésistante (MDR-TB).....	56

# *Introduction*



## ***INTRODUCTION***

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse, mortelle et curable. Elle constitue un fléau mondial en progression et un problème majeur de santé publique. L'OMS estime qu'approximativement un tiers de la population mondiale est infectée par *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose, et qu'environ 2 millions de personnes en meurent chaque année (**Daniel, 2006**).

Au cours de la période 1962-2010, l'Algérie, jadis pays à haute prévalence de tuberculose, a rejoint depuis le début des années 1980 le groupe des pays à prévalence modérée, où l'incidence annuelle de la tuberculose de toutes formes se situe entre 20 et 99 cas pour 100.000 habitants. Cette évolution favorable a accompagné le développement socio-économique du pays et l'application des mesures techniques spécifiques de lutte contre la tuberculose, des mesures qui évoluaient en fonction des progrès des connaissances et des recommandations des institutions internationales (**Manuel de la lutte antituberculeuse, 2011**).

Le nombre de cas de cette maladie augmenterait à l'échelle mondiale de deux pour cent par an. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette situation dramatique parmi lesquels l'épidémie du VIH et l'émergence et la propagation de souches résistantes et multi-résistantes aux antituberculeux (multi-résistantes, MDR). Ces souches ont définies comme des isolats résistants au moins à l'isoniazide (INH) et la rifampicine (RIF), les deux agents antituberculeux les plus puissants (**Dye et al., 1999**).

En utilisant des associations de médicaments (streptomycine (SM), isoniazide (INH), rifampicine (RMP), éthambutol (EMB) et pyrazinamide (PZA)), près de 90% des patients qui ont une tuberculose sensible aux antituberculeux peuvent être guéris en six mois. Le traitement de la tuberculose résistante aux antibiotiques nécessite des schémas de traitement plus longs avec des médicaments dits de seconde ligne qui sont plus coûteux, moins efficaces, moins bien tolérés et les taux de guérison sont par conséquent plus faibles (**Benedek, 2004**).

Vue leur très lente multiplication, les mycobactéries posent un réel problème dans le délai de la remise des résultats au clinicien. En effet, même si l'examen direct peut être contributif, la culture qui nécessite plusieurs semaines reste la méthode de référence dans le diagnostic de tuberculose et des mycobactérioses humaines. En parallèle, les techniques moléculaires permettent un gain de temps précieux dans la prise en charge de la maladie, notamment avec les méthodes d'amplification génique avec la mise en évidence de l'ADN mycobactérien.

L'antibiogramme classique permet de connaître la sensibilité ou la résistance d'une mycobactérie à chaque antibiotique, alors que l'approche moléculaire ne permet que la détection de résistances de support génétique connu. Néanmoins, la facilité et la rapidité d'obtention des résultats en font un outil actuel très intéressant. Notre travail de recherche a consisté à analyser les profils particuliers de tuberculose multirésistante dans l'Ouest Algérien en premier lieu et d'appliquer une technique moléculaire telle que le GeneXpert MTB/RIF pour le diagnostic ainsi que la détection rapide de la résistance à la rifampicine chez des cas suspects de TB-MDR dans la même région.

*Rappel*  
*bibliographique*

## **La tuberculose : un problème de santé publique**

### **I-Pathogénèse et évolution de la maladie**

#### **I-1-Agent causal**

L'histoire de la tuberculose est étroitement liée à celle de l'homme puisque la maladie est déjà mentionnée par les textes des médecines grecque, chinoise, égyptienne et indienne plus de 2000 ans auparavant (Daniel, 2005 ; Daniel, 2006). La tuberculose est une maladie infectieuse causée par une mycobactérie, parasite strict de l'homme. *M.tuberculosis* est le principal agent de la tuberculose humaine.

En bactériologie médicale, on distingue classiquement trois groupes de mycobactéries :

➤ Les espèces du complexe *tuberculosis*. La tuberculose chez l'homme est causée par les mycobactéries du MTbC, principalement par *M. tuberculosis* mais aussi par *M. africanum* et *M. bovis*.

Les cas de tuberculose à *M. africanum* sont quasi exclusivement répertoriés en Afrique de l'Ouest où ils peuvent être responsables de plus de la moitié des cas (Bonard *et al.*, 2000 ; de Jong *et al.* , 2010 ; de Jong *et al.* , 2009 ; de Jong *et al.* , 2010 ; de Jong *et al.* , 2005 ; Haas *et al.*, 1997 ; Meyer *et al.*, 2008 ). *M. bovis* est responsable de la tuberculose bovine et peut contaminer d'autres mammifères (chèvres, moutons, chiens, chats, ...) ainsi que l'homme (Ayele *et al.*, 2004 ; de la Rua-Domenech, 2006 ; O'Reilly *et al.*, 1995). Parmi les autres sous espèces du MTbC, *M. caprae*, *M. microti* et *M. pinnipedii* ont été isolés respectivement chez les caprins (Aranaz *et al.*, 1999 ; Kubica *et al.*, 2003), les rongeurs (Cavanagh *et al.*, 2002) et les mammifères marins ( Cousins *et al.*, 2003), mais leur spécificité pour un hôte défini n'est que relative puisque des souches de ces sous-espèces ont été isolées chez certains autres mammifères, ainsi que chez l'homme ( Lantos *et al.*, 2003 ; Niemann *et al.*, 2000 ; Prodinge, 2007 ; van Soolingen *et al.*, 1998). Enfin, *M. canettii*, est une sous-espèce très rare, majoritairement isolée chez des patients originaires ou ayant séjourné en Afrique de l'Est (van Soolingen *et al.*, 1997) ;

➤ les mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses, responsables des mycobactérioses humaines. Ces mycobactéries sont omniprésentes dans l'environnement. Dans certaines circonstances (immunodépression, lésion, maladie préexistante,...), certaines d'entre elles peuvent devenir pathogènes pour l'homme (Mathys, 2010) ;

➤ *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen, et *M. lepraemurium*, les agents de la lèpre chez l'homme et le rat, caractérisés par leur incapacité à être cultivés *in vitro* (Figure 1) (Mathys , 2010).

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, de la famille des Mycobacteriaceae, de l'ordre des Actinomycetales et de la classe des Actinobactéries (Shinnick et Good, 1994).

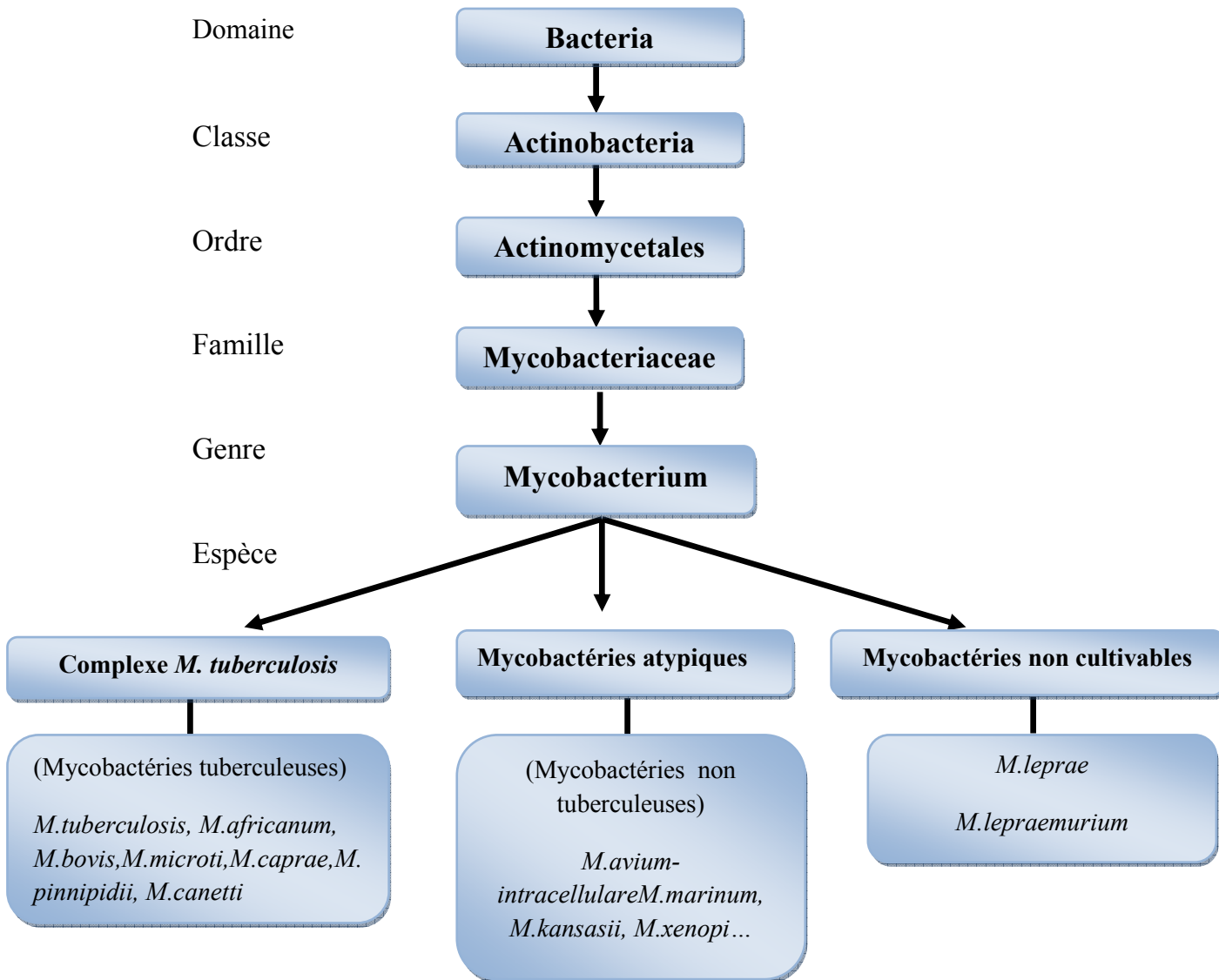


Figure 1 : Taxinomie des mycobactéries (Mathys, 2010).

Les mycobactéries peuvent être réparties en deux groupes taxonomiques selon leur vitesse de croissance en conditions optimales de culture. Les mycobactéries dites à croissance rapide ont un temps de génération de 2 à 5 heures et forment une colonie visible en milieu solide en moins de 7 jours, alors que les mycobactéries à croissance lente ont un temps de génération moyen de 24 heures et mettent plus d'une semaine pour former une colonie. *M.tuberculosis*

appartient à ce dernier groupe et une colonie est observée après 3 semaines d'incubation environ.

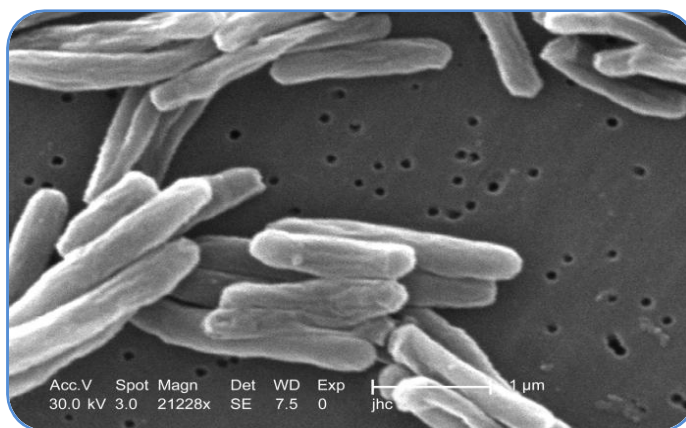
Dès la fin de XIX<sup>e</sup> siècle l'intérêt suscité par le bacille de Koch a favorisé une subdivision taxonomique des mycobactéries basée uniquement sur les rapports de ces bactéries avec *M.tuberculosis*. D'où l'ample utilisation, encore de nos jours, des dénominations des mycobactéries atypiques (**Pinner,1935**), mycobactéries non tuberculeuses(MNT) et les mycobactéries autres que *tuberculosis* (MOTT) pour les mycobactéries qui ne sont pas identifiables comme étant *M. tuberculosis* ou *M. bovis*. Il a fallu attendre les années soixante pour une classification des mycobactéries. Ainsi selon Runyon (**Tableau 1**), mycobactéries atypiques, anonymes ou non classifiées sont artificiellement divisées en quatre groupes d'après leur vitesse de croissance et leur pigmentation (**Runyon, 1960**) :

**Tableau1** : Classification des mycobactéries atypiques selon **Runyon (Nouvel, 2005)**

<b>Groupe I</b>	mycobactéries photochromogènes à croissance lente
<b>Groupe II</b>	mycobactéries scotochromogènes à croissance lente
<b>Groupe III</b>	mycobactéries non chromogènes à croissance lente
<b>Groupe IV</b>	mycobactéries à croissance rapide (RGM pour <i>rapid growth mycobacteria</i> ) pigmentées ou non

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies stricts ou micro aérophiles, immobiles, non sporulés (**Grosset, 1990**) ; Les mycobactéries se caractérisent par une paroi très particulière au sein du monde bactérien qui leur confère, entre autres, des propriétés tinctoriales spécifiques, l'acido-alcool-résistance(BAAR) pour les colorer, il faut donc utiliser la technique de Ziehl-Neelsen ou la coloration à l'auramine et une résistance à de nombreux antibiotiques. *M.tuberculosis* est le principal agent de la tuberculose humaine. En microscopie optique, *M.tuberculosis* est un bacille fin, légèrement incurvé, de 2 à 5 microns de long sur 0,2 à 0,3 microns de large (**Figure 2**). Il se distingue des autres espèces bactériennes par ses exigences de culture et sa lenteur de croissance (de 1 à 8 semaines). *M.tuberculosis* ne croît pas sur les milieux de culture ordinaires. Seuls les milieux qui contiennent du sérum, de la glycérine, de la pomme de terre glycinée, de l'œuf ou de l'albumine bovine permettent une culture abondante. Les milieux de culture les plus employés pour le diagnostic de la tuberculose sont les milieux solides à l'œuf de Löwenstein-Jensen, les milieux gélosés ou liquides de Middle brook supplémentés par de l'OADC (acide oléique, albumine, dextrose et

catalase), et des milieux liquides dérivant du milieu de Youmans. Le temps de division de *M.tuberculosis* étant de 20 heures en moyenne, les cultures sur milieu solide ne sont positives qu'après 21 à 28 jours d'incubation à 37°C, et après un délai un peu plus court (10 à 15 jours) lorsqu'on utilise un milieu liquide et un moyen de détection non optique (radiométrie, fluorescence...). *M.tuberculosis* a une activité catalasique thermolabile (elle disparaît après chauffage pendant 20 minutes), une activité nitrate réductase et accumule de l'acide nicotinique, ce qui peut être révélé par l'épreuve à la niacine (Konno *et al.*, 1957). Ces trois caractéristiques sont les trois caractères biochimiques « types » de cette espèce. Une des caractéristiques majeures des mycobactéries est la richesse de leur paroi en lipides (60%) et, en particulier, en acides mycoliques (acides gras à longue chaîne). Une autre approche phénotypique est représentée par l'analyse des acides mycoliques de la paroi par des techniques chromatographiques en phase gazeuse ou liquide. C'est un bon outil d'identification des mycobactéries, fournissant un résultat définitif en quelques heures. Cependant, l'équipement nécessaire est coûteux et la mise au point est délicate (Soini et Musser, 2001).

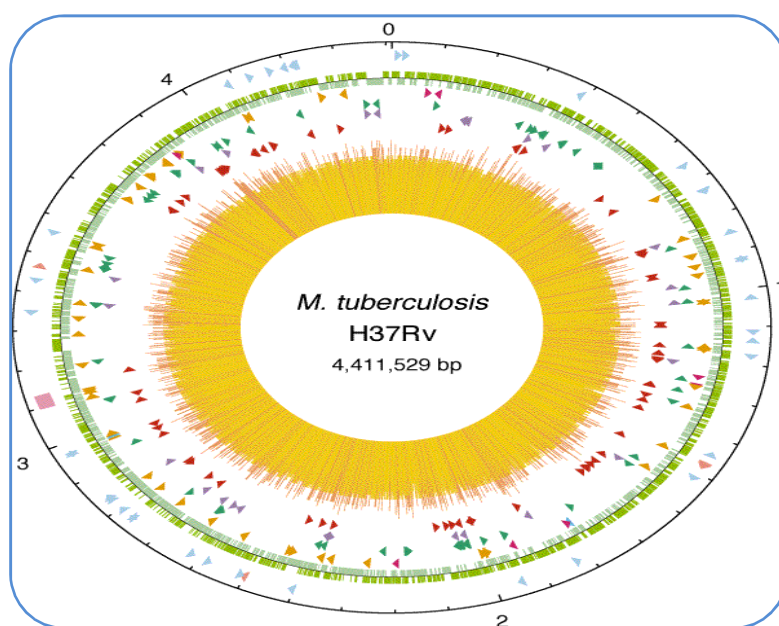


**Figure 2 :** Image de *M. tuberculosis* par microscopie électronique à balayage (21228x) (Mathys, 2010).

La séquence complète du génome de *M.tuberculosis* H37Rv (Figure 3) publiée en 1998 par Steward Cole *et al.* a permis d'expliquer certains caractères propres aux mycobactéries (Cole *et al.*, 1998). Comme chez l'ensemble des mycobactéries (excepté *M.leprae*), le génome de *M.tuberculosis* ( $4,5 \times 10^9$  daltons,  $4,4 \times 10^6$  pb) se caractérise par une teneur en guanine et cytosine (G+C) élevée (65,6%).

Environ 4000 gènes ont été identifiés dans le génome de *M.tuberculosis* et 91% d'entre eux pourraient coder pour des protéines. Le génome de *M.tuberculosis* est riche en séquences répétées d'ADN, en particulier en séquence d'insertion IS6110, spécifiques du complexe

*M.tuberculosis*. La position et le nombre de ces séquences sur le génome sont stables pour une souche donnée, mais variables d'une souche à l'autre. Cette particularité a été mise à profit pour développer l'analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) du génome des souches de bacilles tuberculeux, utile dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques nécessitant la comparaison des souches. Il existe 14 gènes codant pour les protéines antigéniques de la famille ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6). Cet antigène est fortement reconnu par les lymphocytes T humains et provoque une production d'interféron gamma en excès. Des études récentes ont démontrés que certains membres de la famille ESAT-6 seraient impliqués dans le pouvoir pathogène de *M.tuberculosis*. Dès lors, cette famille de protéines est considérée comme très intéressante d'un point de vue diagnostique, préventif (antigène protecteur) et thérapeutique (cible potentielle des médicaments) (Pym *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** Représentation schématique du génome de *M. tuberculosis*H37Rv (Cole *et al.*, 1998).

## I-2-La maladie

### I-2-1- Transmission

La tuberculose est une maladie contagieuse dont la transmission est interhumaine et se fait par voie aérienne. *M.tuberculosis* atteint particulièrement les poumons (tuberculose pulmonaire) mais peut aussi atteindre tous les organes (tuberculose extra pulmonaire). Le bacille se répand dans l'air quand un patient ayant une tuberculose pulmonaire expectore des particules



infectieuses en toussant ou en éternuant. Ces particules, appelées gouttelettes de Pflügge, sèchent rapidement dans l'air, mais peuvent rester en suspension dans une pièce non aérée pendant environ 30 minutes, en conservant leur pouvoir infectieux (**Millet, 2011**). Les lieux de promiscuité importante (prisons, mines, manufactures,...) favorisent la contamination qui est proportionnelle au confinement de l'air (**Beggs et al., 2003 ; Nardell, 1989**). Une contamination peut également avoir lieu suite à la formation d'aérosols lors de la manipulation de lésions tuberculeuses ou d'objets souillés dans les hôpitaux et laboratoires (**Kao et al., 1997**).

Dans la majorité des cas, les bacilles tuberculeux sont arrêtés au niveau du nez, des bronches et bronchioles. Ils sont alors entraînés par le mucus vers le pharynx puis déglutis et détruits par l'acidité de l'estomac (**Mathys, 2010**).

### **I-2-2- Primo-infection**

Dans la minorité des cas, les bacilles atteignent les alvéoles pulmonaires. Là, ils entrent en contact avec les macrophages alvéolaires qui, en général, les phagocytent, les dégradent et les éliminent. Cependant, si les défenses immunitaires innées de l'individu sont réduites, si l'infection est importante (charge bactérienne élevée) ou si la bactérie est fortement virulente, il arrive que des bacilles survivent dans les macrophages et s'y multiplient. Les macrophages colonisés finissent par éclater et libérer un grand nombre de bacilles capables d'infecter, à leur tour, d'autres macrophages. Ainsi, un foyer infectieux se développe au niveau du poumon et provoque la formation d'une lésion ou « chancre d'inoculation ». Le corps de la personne infectée réagit à cette « primo-infection » par le développement d'une réponse immunitaire cellulaire et la formation d'un granulome constitué principalement de macrophages infectés et de cellules T (**Peyron et al., 2008, Kaufmann, 2002**).

Dans 90% des cas, la maladie ne se développe pas. Le granulome se calcifie et les bacilles emprisonnés restent sous contrôle à l'état quiescent, on parle d'« infection tuberculeuse latente (ITL) » (**Smith, 2003**). Ces patients ne sont pas contagieux. Chez la plupart des individus, la « primo-infection » passe inaperçue. La primo-infection peut être mise en évidence chez un patient grâce au test d'hypersensibilité retardée (intradermoréaction à la tuberculine) (**Hopewell et Jasmer, 2005**).

### **I-2-3- Tuberculose active**

Pour les patients immunocompétents, on estime que dans 5% des cas, la PIT peut évoluer en tuberculose maladie ou tuberculose patente dans les 2 ans qui suivent la primo-infection et que dans 5 autres pourcents, cette évolution ne se fera que plusieurs années plus tard (ATS, 2000 ;Dye *et al.*,2005 ). De nombreux facteurs influencent cette transition tels que l'âge du patient infecté (enfants de moins de 15 ans et personnes âgées) ou son statut immunitaire (personnes immunodéprimées) (Moyo *et al.*, 2010). Chez des patients immunodéprimés, cette évolution est beaucoup plus fréquente puisque il est estimé que 50% des patients immunodéprimés infectés par *M.tuberculosis* développeront une tuberculose maladie dans les deux ans suivant leur infection (ATS, 2000). De plus, il a été montré qu'un taux de 5 à 10% des patients porteurs d'une tuberculose latente et contractant le VIH développent une tuberculose maladie par an (Clark-Curtiss et Haydel, 2003 ; Dye *et al.*, 2005 ), soulignant ainsi la complexité de l'association existant entre le VIH et *M. tuberculosis*. Certains autres facteurs, liés aux conditions de vie et aux pratiques addictives des patients infectés, peuvent favoriser cette transition, tels que la malnutrition, l'alcoolisme, le tabagisme, la précarité, la toxicomanie, ou le diabète (ATS, 2000). Enfin, la charge bactérienne, la pathogénicité et la virulence de la population bactérienne, et les facteurs génétiques de susceptibilité de l'hôte pourraient aussi intervenir dans l'évolution de la primo-infection à la tuberculose maladie (Kristi et Fiuza de Melo, 2007).

#### Tuberculose pulmonaire

La tuberculose-active ne se développe que chez environ 10% des personnes infectées par *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2002). Elle peut se développer soit directement après la primo-infection, soit après plusieurs années suite à la réactivation de l' « infection tuberculeuse latente ». Dans ce cas, la lésion précédemment formée se nécrose et les bacilles tuberculeux quiescents sont libérés (Smith, 2003). La tuberculose active s'accompagne de signes cliniques et/ou radiologiques. Les signes cliniques de la tuberculose pulmonaire sont une toux persistante avec des expectorations parfois accompagnées de sang, une douleur thoracique et des symptômes plus généraux comme fièvre, sudation nocturne, fatigue, perte d'appétit, et amaigrissement. Un diagnostic peut être proposé par radiographie ou scanner du thorax du patient.

### Tuberculose extra-pulmonaire

La tuberculose pulmonaire (ou phtisie) est la forme la plus commune de la tuberculose (85% des cas), cependant les bacilles tuberculeux peuvent, plus rarement, être transportés dans tout l'organisme, via les systèmes lymphatique et sanguin, créer de nouveaux foyers infectieux et provoquer une tuberculose extra-pulmonaire (15% des cas) (**Hopewell et Jasmer, 2005**). Les bacilles peuvent infecter différents organes du corps tels que les os, les reins, les ganglions, les méninges, l'intestin, la peau,....

Lorsque la tuberculose est extra-pulmonaire, les symptômes peuvent varier en fonction de la région corporelle atteinte et la radiographie pulmonaire, réalisée habituellement suite à la détection d'une IDR positive, n'apporte aucune information complémentaire dans ce cas (**Baydur, 1977**).

## **II-Diagnostic et dépistage de la tuberculose**

La suspicion d'une tuberculose chez un patient, suite à l'altération générale de son état de santé ou dans le cadre d'un contexte épidémiologique favorable, conduira à la mise en place d'une démarche diagnostique, à la réalisation d'examen cliniques et bactériologiques puis, dans un certain nombre de cas, à la mise sous traitement du patient (**Mathys, 2010**). Actuellement, le diagnostic microbiologique de la tuberculose et des mycobactérioses repose toujours sur l'examen direct et la culture mais connaît une évolution importante grâce au développement de nouvelles techniques moléculaires, directement applicables aux échantillons cliniques, notamment respiratoires (**Piersimoni et Scarparo, 2003**).

### **II-1- Dépistage de la tuberculose latente (primo-infection)**

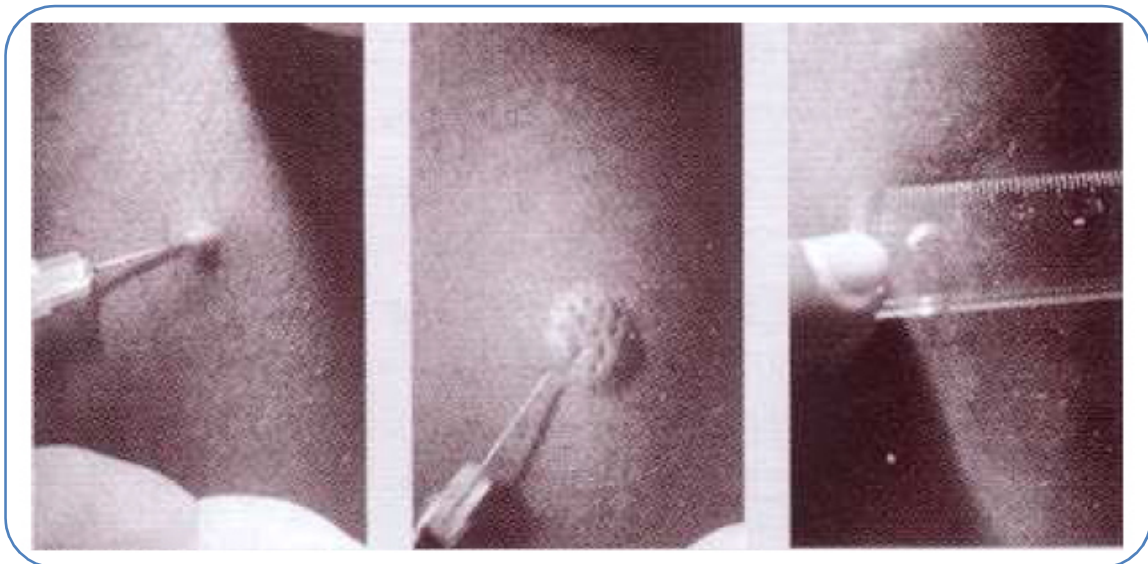
Dans le cas d'une tuberculose latente, celle-ci ne s'accompagne généralement ni de symptômes, ni de signes cliniques, ni de signes radiologiques. Son diagnostic s'effectue le plus souvent dans le cadre d'un contexte épidémiologique favorable (arrivée en provenance d'un pays à forte endémicité de tuberculose, personnes infectées par le VIH, ...) ou d'une enquête de dépistage effectuée dans l'entourage d'un patient ayant une tuberculose avérée, et repose essentiellement sur l'intradermo-réaction (IDR) ou test de Mantoux.

Plus récemment, des tests basés sur la détection *in vitro* du taux d'interféron gamma après stimulation des lymphocytes T par des antigènes de *M. tuberculosis* ont été développés, tels que T-SPOT.TB® test (Oxford Immunotec Ltd) ou encore Quanti FERON®-TB GOLD (Cellestis Ltd) (**Millet, 2012**).

### **II-1-1-IDR : l'intradermo-réaction à la tuberculine (test de Mantoux)**

Il s'agit d'un test d'hypersensibilité retardée provoquée par l'afflux de lymphocytes T et de macrophages au niveau du site d'injection intradermique de tuberculine (antigènes mycobactériens). Cette réaction témoigne de l'existence d'une immunité à médiation cellulaire vis-à-vis des mycobactéries chez le patient, induite soit par une vaccination préalable par le BCG, soit par un contact antérieur avec le BK ou certaines mycobactéries atypiques (Millet, 2011).

Cette épreuve consiste en l'injection intradermique (face antérieure de l'avant-bras) d'un mélange de protéines tuberculeuses purifiées appelé PPD (Purified Protein Derivative) ou tuberculine. Une réaction positive à ce test se traduit, 48 à 72 heures après l'injection, par une rougeur et une induration de la peau (> 10 mm de diamètre) au niveau du site d'injection (présence d'une immunité cellulaire contre *M.tuberculosis*) (Figure 4).



**Figure 4 :** Intradermoréaction à la tuberculine (FARES, 2006a).

#### *Autres tests immunologiques*

Des tests immunologiques (QuantiFERON-TB-Gold® et TSPOT-TB®), utilisant les lymphocytes T du patient pour mesurer la production d'interféron- $\gamma$ , ont été développés, plus récemment, pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (Hadj *et al.*, 2006, Lalvani, 2007). Ces tests reposent sur le principe suivant lequel des lymphocytes T préalablement sensibilisés par des antigènes tuberculeux (*in vivo*) produisent des concentrations élevées d'IFN- $\gamma$  lorsqu'ils sont réexposés aux mêmes antigènes mycobactériens (*in vitro*). Ces tests présentent comme avantage de ne pas être perturbés par une vaccination antérieure au BCG ou par une infection causée par une autre mycobactérie (Al-Orainey, 2009 ; Bocchino *et al.*, 2009 ; Richeldi, 2006).

## **II-2- Diagnostic de la tuberculose maladie**

Pour une tuberculose maladie, les signes cliniques viennent orienter le diagnostic, qui repose alors sur la radiographie des poumons, et sera confirmée par des examens bactériologiques.

### **II-2-1- L'examen radiologique**

La radiographie pulmonaire permet d'établir le bilan initial des lésions thoraciques pouvant être de morphologie et d'étendue variable, sans rapport avec l'intensité de la maladie. On retrouve trois types de lésions élémentaires : le nodule, l'infiltrat et la caverne. Dans sa forme pulmonaire, la tuberculose se manifeste par la présence d'infiltrats et de nodules principalement localisés dans les sommets des poumons et parfois associés à des cavernes.

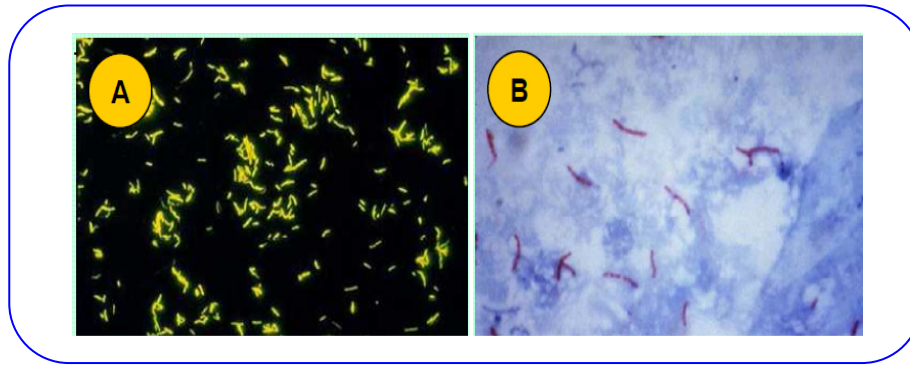
### **II-2-2- Confirmation du diagnostic : l'examen bactériologique**

La mise en évidence de la présence de *M. tuberculosis* dans des prélèvements biologiques constitue le véritable diagnostic de tuberculose. En cas de tuberculose pulmonaire, les examens bactériologiques seront pratiqués avant tout traitement sur l'expectoration du malade trois jours de suite. Ils peuvent aussi être pratiqués sur des tubages gastriques (sécrétions bronchiques dégluties) ou des aspirations bronchiques.

#### *a- L'examen microscopique*

Un frottis, ou étalement du prélèvement biologique sur lame mince est effectué, puis coloré afin de mettre en évidence la propriété spécifique des mycobactéries : leur acido-alcoolo résistance. Pour cela, deux méthodes peuvent être utilisées, la méthode de Ziehl-Neelsen, ou celle de l'auramine (fluorochrome). La coloration de Ziehl-Neelsen fait apparaître les Bacilles Acido-Alcoolo-Résistants (BAAR), sous forme de petits bâtonnets rouges isolés ou en petits amas sur fond bleu, tandis qu'ils apparaîtront comme de petits bâtonnets jaunes-verts brillants sur fond sombre avec la coloration à l'auramine (**Figure 5**).

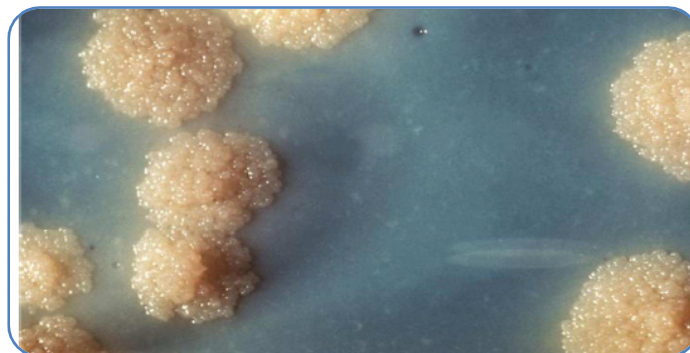
Il est important de souligner que l'examen direct de BAAR dans un prélèvement biologique ne permet pas de faire la distinction entre *M. tuberculosis* et les autres mycobactéries. De plus, cette méthode ne permet pas de détecter la présence de BAAR dans un prélèvement biologique pauci bacillaire puisqu'il a, en effet, été montré que l'examen direct ne détectait la présence de BAAR qu'à partir de 0,5 à 1,1 bactéries par microlitre de prélèvement biologique (**Saltini, 2006**).



**Figure 5** : Observation microscopique des BAAR: (A) coloration à l’Auramine et (B) coloration de Ziehl-Nelsen (Millet, 2011).

*b- La culture*

La culture aérobie sur milieu spécifique de Löwenstein-Jensen ou de Coletsos (milieux solides). Seule une culture positive à *M. tuberculosis* constitue une preuve formelle du diagnostic d’une tuberculose. Sur milieu de culture solide, les principales caractéristiques macroscopiques étudiées sont la vitesse d’apparition de la colonie, le nombre de colonies, leur aspect rugueux ou lisse, la présence ou non d’une pigmentation, tandis que sur milieu liquide, c’est l’aspect du frottis qui permet d’orienter l’identification. Ainsi, sur milieu solide de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent en quatre à six semaines et sont d’aspect rugueux dit en « chou-fleur », de couleur crème et eugéniques (Figure 6) (Mathys, 2010).



**Figure 6** : Aspect des colonies sur milieu de culture solide (Mathys , 2010).

Si la mise en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen constitue la méthode la plus couramment utilisée du fait de son faible coût et de sa grande sensibilité, de nouvelles

techniques, en milieu liquide, ont été développées afin de réduire ce temps d'attente (**Heifets et Desmond, 2005**) :

- la méthode radiométrique « BACTEC 460 TB » qui consiste en la mise en culture de l'échantillon provenant du patient dans un flacon contenant de l'acide palmitique marqué au  $^{14}\text{C}$ . La croissance mycobactérienne est détectée par mesure de la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  produite dans le flacon, suite à l'utilisation de l'acide palmitique marqué par les bactéries en croissance (**Kirihara et al., 1985**). En général, un résultat positif est obtenu en 7 à 10 jours. D'autres systèmes à détection automatisée mais non radioactifs sont maintenant également disponibles.

- « BacT/ALERT 3D » : qui détecte la croissance mycobactérienne grâce à une pastille située à la base du flacon de culture. Celle-ci subit une modification colorimétrique lors de l'acidification du milieu résultant de la production de  $\text{CO}_2$  par les bactéries en croissance (**Werngren et al., 2006**).

- « BACTEC MGIT 960 » : qui utilise des flacons de culture contenant un sel de ruthénium dont la fluorescence est d'autant plus importante que la pression en  $\text{O}_2$  est faible. Toute croissance sera donc détectée par augmentation de la fluorescence (**Pheiffer et al., 2008**).

### *c-L'identification*

#### ➤ Les tests biochimiques

Selon ces caractères d'orientation, différents tests biochimiques peuvent être mis en œuvre pour obtenir un diagnostic (**Metchock et al., 2001**). Ils évaluent la thermosensibilité de la catalase, la production de niacine, la réduction des nitrates, la croissance en présence d'acide thiophène-2-carboxylique (TCH), l'activité arylsulfatasique, l'hydrolyse du Tween, l'activité  $\beta$ -glucosidasique et l'activité uréasique. *Mycobacterium tuberculosis* a une catalase thermolabile, produit de la niacine (ou acide nicotinique), réduit les nitrates, et pousse en présence de TCH. Les autres tests biochimiques ont été développés pour l'identification des mycobactéries atypiques. Une autre approche phénotypique est représentée par l'analyse des acides mycoliques de la paroi par des techniques chromatographiques en phase gazeuse ou liquide. C'est un bon outil d'identification des mycobactéries, fournissant un résultat définitif en quelques heures. Cependant, l'équipement nécessaire est coûteux et la mise au point est délicate (**Soini et Musser, 2001**). Si l'identification n'est toujours pas formelle ou par mesure de contrôle, des outils supplémentaires existent tels que les sondes nucléiques ou les tests basés sur la PCR (**Millet, 2011**).

➤ Amplification génique

L'identification des mycobactéries isolées en culture est désormais faite à partir des cultures par des techniques moléculaires plutôt que biochimiques. Aujourd'hui, de nombreuses techniques moléculaires adaptées au diagnostic de la tuberculose sont utilisées, dont notamment l'amplification génique (PCR) permettant la détection de séquences nucléiques spécifiques; le séquençage, qui permet l'analyse de fragments polymorphiques spécifiques d'espèces; et l'hybridation d'ADN tuberculeux sur sondes spécifiques. Les tests d'amplification génique peuvent également être utilisés directement sur des prélèvements (avant culture) pour distinguer les bacilles de tuberculose des mycobactéries atypiques dans les prélèvements à examen microscopique positif (BAAR +), notamment chez les patients immunodéprimés (**Piersimoni et Scarparo, 2003**).

*d-Antibiogramme*

L'antibiogramme ne constitue pas en lui-même un acte de diagnostic de la tuberculose mais peut aider à la détermination de l'espèce incriminée en cas de présence d'une mycobactérie atypique (**Millet, 2011**).

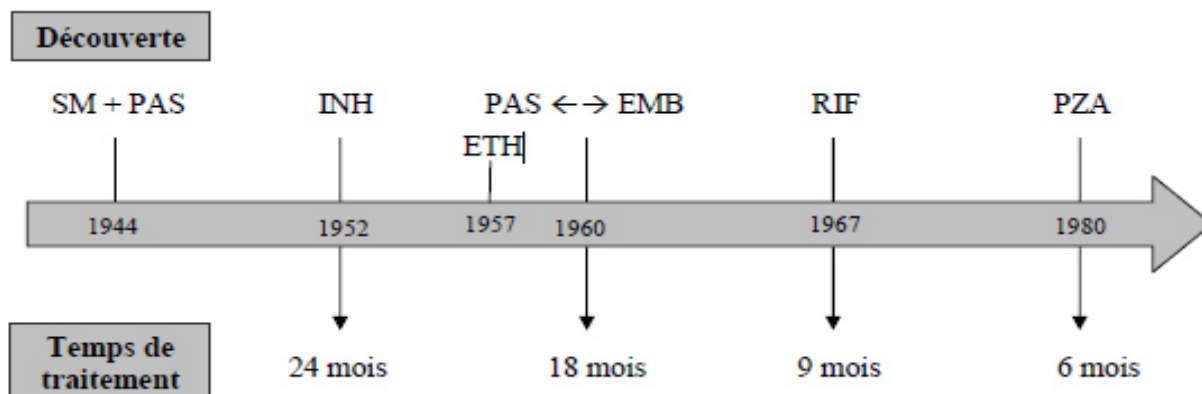
### **III- Traitement de la tuberculose**

#### **III-1-Histoire du traitement antituberculeux**

Avant l'introduction des antibiotiques, de nombreux remèdes « douteux » furent proposés pour traiter la tuberculose. Certains proposaient des concoctions d'herbes, des régimes alimentaires ou simplement du repos. D'autres proposaient des méthodes moins bénignes, telles que saignées, injection d'air dans les poumons,..... affaiblissant encore davantage le patient. Divers composés furent également testés, tels que le sanocrysin (sel d'or proposé par Robert Koch), la vitamine D, des sulphones, ... leur efficacité sur le patient ne fut jamais prouvée (**Benedek, 2004, Dutau, 2005**). A l'époque, on considérait que la tuberculose tuait un patient sur deux soit 50% des malades. La découverte des sulfonamides et de la pénicilline au cours des années 30 marqua le début de la thérapie antimicrobienne. En 1944, les deux premières avancées majeures dans le traitement de la tuberculose ont été notées. En effet, Waksman mit en évidence l'activité anti tuberculeuse de la streptomycine (SM) et Lehman synthétisa l'acide para-aminosalicylique (PAS), également actif sur *M. tuberculosis*. Dès le début de son utilisation, la streptomycine a marqué des cas de résistance (**Mc Dermott,**



1947, Youmans *et al.*, 1947). Des essais cliniques furent réalisés (de 1944 à 1949) afin de comparer le PAS ou la SM, seuls et en combinaison (**Medical Research Council, 1950**). Les résultats montrèrent un net avantage de la thérapie combinée à la fois pour la guérison et pour prévenir l'apparition de souches résistantes (fréquente lors de l'utilisation d'un seul antibiotique en traitement). En 1952, Domagk découvrit l'isoniazide (INH), un composé clef pour le traitement de la tuberculose. La thérapie combinée PAS+SM évolua alors vers une triple thérapie INH+PAS+SM, qui assurait la guérison de 90 à 95% des patients. La durée du traitement restait problématique ; 24 mois étaient nécessaires pour obtenir la guérison du patient. En 1960, la durée du traitement fut réduite à 18 mois suite au remplacement du PAS par l'éthambutol (EMB). L'étape suivante et importante dans l'évolution de la thérapie antituberculeuse, fut la découverte de la rifampicine (RIF) en 1967. Les tests montrèrent que la RIF, par son effet stérilisant, en présence d'INH, permettait de réduire encore la durée de traitement de 18 à 9 mois (**Webb et Davies, 1999**). En 1980, la pyrazinamide (PZA) fut introduite dans le schéma de base du traitement de la tuberculose. Cet antibiotique, en présence de l'INH et de la RIF, permit d'obtenir la guérison de plus de 95% des patients en seulement 6 mois (**Webb et Davies, 1999**) (**Figure 7**).



**Figure 7** : Représentation schématique de l'évolution du traitement de la tuberculose (et de sa durée) au cours du temps (**Ouardi ,2013**)

## **III-2-Moyens de lutte**

### **III-2-1- Moyens préventifs :**

#### *a- DOTS et Halte à la tuberculose*

En 1995, soit 2 ans après avoir reconnu la tuberculose comme urgence mondiale, et devant l'ampleur de l'épidémie, l'OMS met en place une stratégie de lutte contre la tuberculose reposant sur le traitement chimio-prophylactique standardisé de courte durée des patients ou stratégie DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course). Les objectifs principaux annoncés de ce plan de lutte étaient la détection de 70% des cas de tuberculose maladie et la guérison de 85% d'entre eux d'ici l'an 2000 lequel reposait sur 5 principes :

- L'engagement des gouvernements et des pouvoirs public
- Un dépistage de qualité reposant sur l'examen direct de frottis
- Un traitement normalisé des patients avec surveillance directe de la prise du traitement
- L'approvisionnement ininterrompu en antituberculeux de qualité
- Le suivi et l'évaluation des effets de la mise en place du programme DOTS

En 2001, après des résultats encourageants obtenus avec la stratégie DOTS mais face à la dégradation de la situation épidémique dans certains pays d'Afrique et d'Europe de l'est notamment, l'OMS décide de renforcer la stratégie DOTS et lance le plan mondial « halte à la tuberculose » visant « un monde sans tuberculose » et dont l'objectif principal est de réduire drastiquement l'incidence de la maladie dans le monde d'ici 2015. La tuberculose sera considérée comme éradiquée lorsque son incidence passera en dessous du seuil de un cas pour 1 000 000 d'habitants par an (**WHO, 2010**). Ainsi, le programme propose de lutter contre les principaux facteurs favorisant la propagation de la maladie et s'organise en six lignes directrices:

- Poursuivre l'extension du programme DOTS,
- Lutter contre les cas de co-infection tuberculose/VIH et les tuberculoses multirésistantes aux traitements médicamenteux,
- Contribuer au renforcement des systèmes de santé
- Impliquer l'ensemble des soignants
- Donner des moyens d'agir aux malades et aux communautés,
- Renforcer la recherche

Enfin, la tuberculose est une maladie sociale reflétant souvent la dégradation des conditions de vie d'une population. De ce fait, une étude récente a suggéré que les plans de lutte contre

cette épidémie intègrent aussi, et c'est là une difficulté, la lutte contre les facteurs de risque de contracter et de développer la maladie, incluant les conditions de vie et de travail dégradées, la malnutrition, le tabac, le diabète, l'alcoolisme, et la pollution de l'air (**Corbett et al., 2003 ;Lönnroth et al., 2009**).

*b- La vaccination (BCG)*

Mis au point entre les années 1908 et 1921, le vaccin préparé à partir du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est, encore actuellement, le seul disponible contre la tuberculose humaine. La vaccination par le BCG consiste à injecter par voie intradermique des bacilles tuberculeux bovins atténués par 230 passages successifs sur un milieu à base de pomme de terre glycinée, de manière à stimuler une réaction immunitaire à médiation cellulaire et humorale de l'organisme sans pour autant provoquer la maladie (**Ait-Khaled et Enarson, 1999**). Injecté dès la naissance ou pendant l'enfance, il protège l'individu pendant 50 à 60 ans mais avec une efficacité décroissante au cours du temps et extrêmement variable selon la zone géographique considérée et la localisation de la maladie (**Andersen et Doherty, 2005; Aronson et al., 2004**). Le vaccin BCG confère une meilleure protection contre les formes graves de tuberculose (milliaire, extrapulmonaire ou méningée) que contre les formes pulmonaires. Il n'empêche pas la survenue d'une primo-infection tuberculeuse, et encore moins la réactivation d'une tuberculose pulmonaire latente. Son effet sur la transmission du bacille tuberculeux est par conséquent limité. Néanmoins l'OMS maintient ses recommandations concernant la vaccination systématique des enfants dès la naissance dans les pays à forte prévalence de tuberculose du fait de l'effet protecteur avéré du vaccin BCG contre la méningite tuberculeuse et la tuberculose disséminée chez l'enfant (**WHO , 2004**).

### **III-2-2-Moyens de traitement**

Les objectifs principaux du traitement par chimiothérapie de la tuberculose sont :

- de guérir le malade,
- d'éviter qu'il ne décède d'une tuberculose évolutive ou de ses effets tardifs,
- d'éviter les rechutes,
- de réduire la transmission de la tuberculose à d'autres personnes,
- d'éviter l'apparition d'une résistance acquise aux antituberculeux.

Pour atteindre ces objectifs, le traitement de la tuberculose repose sur l'association de plusieurs antibiotiques antituberculeux, les principaux étant l'isoniazide (INH), la rifampicine

(RIF), la pyrazinamide (PZA), l'éthambutol (EMB), et la streptomycine (SM). L'association de plusieurs antituberculeux permet en effet de réunir 3 propriétés essentielles au traitement : un effet bactéricide (INH, RIF, PZA, SM), un effet stérilisant (RIF) et la capacité de prévenir l'apparition d'une résistance (**WHO, 2003**). L'OMS a par ailleurs défini des schémas thérapeutiques normalisés adaptés en fonction du type de tuberculose rencontré mais aussi en fonction des systèmes de santé des pays qui auront à les appliquer et de leurs moyens financiers disponibles. Ces schémas normalisés présentent l'avantage de :

- réduire le risque d'erreur de prescription et par conséquent, celui de l'apparition d'une pharmacorésistance,
- faciliter l'estimation des besoins en médicaments ainsi que l'achat, la distribution et la surveillance des médicaments,
- simplifier la formation du personnel,
- réduire les coûts,
- favoriser un approvisionnement régulier en médicaments lorsque des patients se déplacent d'une région à une autre (**Millet, 2011**).

### **III-3-Régime de traitement antituberculeux**

#### **III-3-1- Médicaments anti-tuberculeux de première ligne**

*a- L'isoniazide :*

L'isoniazide (INH, acide isonicotinique hydrazide) est un antibiotique synthétique dont l'activité antituberculeuse a été mise en évidence en 1952 (**Fox, 1952 ; Bernstein et al., 1952**). Sa spécificité pour les mycobactéries, sa haute efficacité et sa faible toxicité pour le patient ont fait de cette molécule le pilier de la lutte contre la tuberculose dans le monde entier. Bien que la structure de la molécule soit relativement simple (**Figure 8**), le mécanisme d'action de l'INH est complexe (**Vilcheze et Jacobs, 2007**). Il fallut attendre les années 70, soit environ vingt ans après sa découverte, pour qu'une étude montre que l'INH agit sur la paroi du bacille par inhibition de la synthèse des acides mycoliques, modifie l'activité peroxydasique, inhibe la glycolyse et la biosynthèse des acides nucléiques (**Winder et Collins, 1970**). Ces résultats menèrent progressivement à l'hypothèse que la cible de l'INH devait être impliquée dans l'élongation des acides mycoliques (**Takayama et al., 1972, Takayama et al., 1975**).

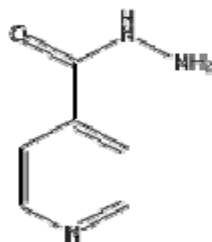


Figure 8 : Structure de l'isoniazide (Fox, 1952).

*b- La rifampicine*

La rifampicine (RIF) est un dérivé demi synthétique de la rifamycine (Figure 9) (Grumbach, 1969 ; Mandell, 1980). Elle fut introduite dans le traitement anti-tuberculeux en 1972 et son activité bactéricide est puissante. La RIF est active à la fois sur les bacilles tuberculeux en croissance mais aussi sur les bacilles semi-dormants (non-divisants). L'introduction de la RIF dans le traitement anti-tuberculeux permet de réduire sa durée de 1 an à 9 mois et ensuite à 6 mois par l'introduction supplémentaire de la pyrazinamide. Le mécanisme d'action de la RIF a été largement étudié chez *E. coli* (Wehrli *et al.*, 1968, McClure et Cech, 1978). La RIF Elle bloque la synthèse protéique au stade initial de la formation de l'ARN messager en inhibant l'ARN polymérase ADN dépendante bactérienne. Un mécanisme similaire a été décrit chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* (Levin et Hatfull, 1993).

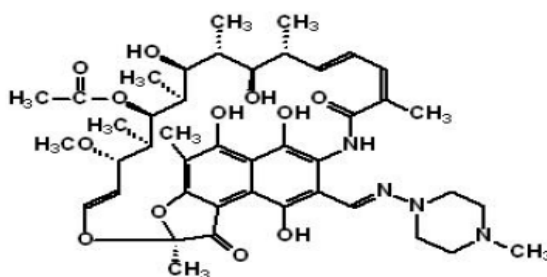
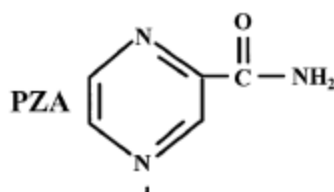


Figure 9: Structure de la rifampicine (RIF) (Mandell, 1980).

*c- La pyrazinamide*

Comme l'isoniazide, la pyrazinamide (PZA) est un analogue structurel du nicotinamide (Figure 10). La PZA présente une excellente activité stérilisante sur les bacilles tuberculeux semi-dormants (persistants) et son introduction dans le traitement de base de la tuberculose, a permis de réduire la durée du traitement (6 mois au lieu de 9-12 mois) (Zhang et Mitchison, 2003). La pyrazinamide est une pro-drogue qui doit être convertie en acide pyrazinoïque

(POA) pour être active. Cette activation est assurée par l'enzyme pyrazinamidase de la mycobactérie (Konno *et al.*, 1967, Trivedi et Desai, 1987). Le mode d'action de la pyrazinamide est assez inhabituel. En effet, son effet bactéricide sur *M. tuberculosis* se manifeste uniquement en milieu acide (ex : pH 5.5) (Mc Dermott et Tompsett, 1954 ; Zhang *et al.*, 1999). De plus, cet antibiotique n'a pas d'effet bactéricide *in vitro* ni sur *M.tuberculosis* ni sur les mycobactéries à croissance rapide.



**Figure 10:** Structure de la pyrazinamide (PZA) (Zhang *et al.*, 1999).

#### *d*-L'éthambutol

L'éthambutol est le dérivé de l'éthylène diamine ((S,S')-2,2'-(éthylènediimino)-di-1-butanol) (Figure 10) (Huchon, 1982). EMB est un antibiotique spécifiquement actif sur les mycobactéries, bactériostatique sur *Mycobacterium tuberculosis*, *bovis* et *africanum*, mais pas sur la plupart des mycobactéries non tuberculeuses, sauf *Mycobacterium kansasii* et *terris*, (Cambau *et al.*, 2003). Bien que son activité soit bactériostatique sur les bactéries en division (Jindani *et al.*, 1980), la cible de l'EMB est une arabinosyl transférase impliquée dans la polymérisation des arabinans de la paroi (Mikusova *et al.*, 1995). L'inhibition de cette enzyme par l'EMB provoque un blocage de la synthèse de l'arabinogalactan et du lipoarabinomannan, les polysaccharides majeurs de la paroi mycobactérienne (Takayama et Kilburn, 1989 ; Deng *et al.*, 1995). Il provoque également une accumulation d'intermédiaires de synthèse et des acides mycoliques, qui perdent leur point d'ancrage dans la paroi (Mikusova *et al.*, 1995). Le mécanisme par lequel l'EMB agit sur l'arabinosyl transférase est encore inconnu.

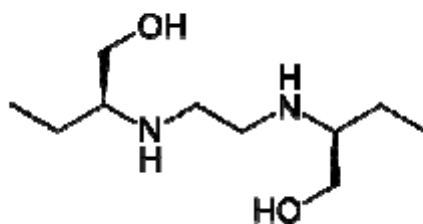


Figure 11: Structure de l'éthambutol (EMB) (Huchon, 1982).

### III-3-2-Médicaments anti-tuberculeux de deuxième ligne

L'émergence de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antibiotiques de première ligne a renouvelé l'intérêt pour les agents antimycobactériens de seconde ligne et pour le développement de nouveaux antibiotiques.

#### *a*-L'acide para-aminosalicylique (PAS)

L'activité bactériostatique de l'acide p-aminosalicylique (PAS) (Figure 11) sur *M. tuberculosis* fut découverte par Lehmann en 1943 (Lehmann, 1946 ; Youmans *et al.*, 1947). Cette découverte fut suivie de deux essais cliniques concluants, en 1944 et 1949 (TTC-SNAT, 1950). Suite à la découverte presque simultanée de la streptomycine (SM), ces nouveaux agents antimycobactériens apportèrent beaucoup d'espoir dans la lutte contre la tuberculose (Murray, 2004).

Le PAS fut réintroduit aux Etats-Unis en 1992, suite à plusieurs épidémies causées par des isolats multirésistants (CDC, 1992). Depuis, le besoin de nouveaux antibiotiques pour le traitement de la tuberculose multirésistante a mené au développement d'une nouvelle formulation du PAS, qui a prouvé être moins toxique (De Loguet *al.*, 2002). A l'heure actuelle, le PAS est utilisé principalement comme antibiotique de seconde ligne pour le traitement de tuberculoses multirésistantes (WHO, 2000). Malgré ce regain d'intérêt, le mécanisme d'action du PAS est toujours incompris.

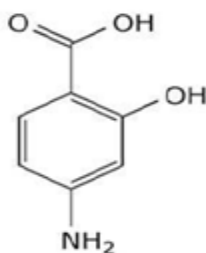
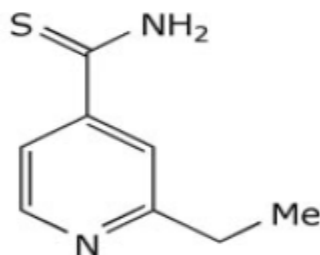


Figure 12: Structure de l'acide p-aminosalicylique (Lehmann, 1946).

*b-L'éthionamide*

L'éthionamide (ETH, 2-éthylthioisonicotinamide) est un important agent anti-tuberculeux de deuxième ligne, prescrit depuis plus de 35 ans (Rist, 1960) (Figure 12). L'utilisation de cet antibiotique est associée à des troubles gastro-intestinaux et une toxicité hépatique. Ces effets secondaires importants expliquent sa prescription limitée au traitement de patients atteints de tuberculose multirésistante (MDR-TB).



**Figure 13** : Structure de l'éthionamide (ETH, 2-éthylthioisonicotinamide (Rist, 1960)

*c-Aminoglycosides*

La streptomycine (SM) est une base ternaire formée de 3 glycosides : la streptidine, le streptose, et la N méthylglucosamine (Horton, 1982). La SM est un antibiotique de type aminoglycoside actif contre toute une série d'espèces bactériennes, y compris *M.tuberculosis*. La SM détruit activement les bacilles en multiplication, mais est inactive contre les bacilles « dormants » ou intracellulaires (Mitchison et Selkon, 1956). Les aminoglycosides (streptomycine SM ; kanamycine KM ; amikacine AMK ; capreomycine CPM) sont des inhibiteurs de la synthèse protéique des mycobactéries et interagissent avec les protéines ribosomales (Zhang et Telenti, 2000).

*d-Fluoroquinolones*

Les fluoroquinolones (FQ) sont des dérivés fluorés de l'acide nalidixique utilisés dans le traitement des infections urinaires à bacille à Gram négatif. Les FQ sont actives *in vitro* sur *Mycobacterium tuberculosis* (Cynamon, 1989; Hooper, 1991; Ji, 1991). Des FQ (ciprofloxacine CFX ; ofloxacine OFX ; sparfloxacine SFX) agissent en inhibant l'ADN gyrase des mycobactéries (Zhang et Yew, 2009).



## **IV- Tuberculose à germes résistants aux antibiotiques antituberculeux : généralités et mécanismes de résistance**

### **IV-1-Histoire de la résistance aux antituberculeux**

L'histoire de la résistance à l'égard des médicaments antituberculeux est assez récente, puisqu'elle est apparue il y a juste 60 ans avec le développement des médicaments antituberculeux (Lehmann, 1964 ; Long et Ferebee, 1950). Pendant des décennies, le problème a été identifié dans des zones localisées, chez des patients traités dans des centres de référence au sein des pays industrialisés (Caminero, 2006 ; ATS, 1966). Avec la découverte de la rifampicine (RMP) en 1966 et l'expansion de son utilisation entre 1970 et 1990, chez les patients qui étaient déjà porteurs de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à l'isoniazide (INH) sont apparues des souches résistantes à la RMP. Ce fut le début d'un problème progressivement croissant, la tuberculose à germes multirésistants aux médicaments (TB-MDR), qui a atteint des proportions épidémiques dans certains pays. Guérir la TB chez ces patients est difficile, puisqu'ils sont porteurs de souches résistantes aux deux médicaments les plus efficaces (WHO, 2008). Au cours des deux dernières décennies, en raison d'un mauvais usage d'autres médicaments actifs contre la tuberculose, particulièrement les fluoroquinolones (FQ), les meilleurs médicaments de deuxième ligne, la résistance s'est étendue vers la TB à germes ultrarésistants (TB-XDR) (WHO, 2007; Caminero, 2008).

### **IV-2- Généralités**

#### **IV-2-1- Définition de la résistance bactérienne à un antibiotique**

La « résistance à un antibiotique » est un caractère phénotypique caractérisant la capacité d'une bactérie à survivre (et à se multiplier), en présence de cet antibiotique, à une concentration qui est habituellement bactéricide ou bactériostatique (Zhang *et al.*, 2005). La résistance d'une bactérie à un antibiotique entraîne la perte d'efficacité de ce médicament lors du traitement d'une infection causée par cette bactérie. Cette situation nécessite l'adaptation du traitement.

#### **IV-2-2-Résistance de *M.tuberculosis* aux antibiotiques antituberculeux**

*a-Résistance naturelle et résistance acquise*

##### ➤ Résistance naturelle

Les mycobactéries du complexe *tuberculosis* sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques comme les  $\beta$ -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides

et les glycopeptides (Veziriset *al.*, 2005). Les mycobactéries non-tuberculeuses présentent également une résistance naturelle à ces antibiotiques usuels. De plus, elles sont naturellement résistantes à la plupart des antibiotiques efficaces sur *M.tuberculosis* tels que l'isoniazide, la pyrazinamide, l'éthambutol, l'acide p-aminosalicylique...(Veziriset *al.*, 2005).

La faible perméabilité de la paroi mycobactérienne est, en général, mise en cause pour expliquer le haut niveau de résistance naturelle des mycobactéries (Jarlier et Nikaido, 1994).

La paroi mycobactérienne présente une architecture caractéristique et particulièrement complexe (Figure 14). Son squelette est composé de trois éléments majeurs associés de manière covalente: le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques. Les acides mycoliques sont de longues chaînes d'acides gras (de 60 à 90 atomes de carbone) insérées parallèlement les unes par rapport aux autres et formant un arrangement compact perpendiculaire au plan de la membrane plasmique (Nikaido *et al.*, 1993). Ainsi, les acides mycoliques constituent une enveloppe lipidique très peu perméable aux composés hydrophiles et en particulier à bon nombre d'antibiotiques. Il a été estimé que la paroi des mycobactéries est, par exemple, 100 à 1000 fois moins perméable au  $\beta$ -lactamines que la paroi d'*E. coli* (Jarlier *et al.*, 1991).

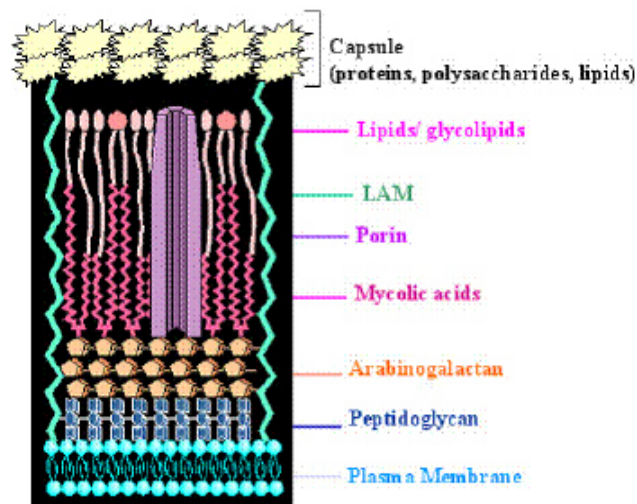


Figure 14 : structure de la paroi des mycobactéries (Mathys , 2010).

La structure de la paroi n'est pas la seule responsable de la haute résistance naturelle de *M.tuberculosis*. La production d'enzymes modifiant les antibiotiques a également été décrite chez *M. tuberculosis* comme, par exemple, la  $\beta$ -lactamase responsable de la résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines (Voladri *et al.*, 1998) ou l'aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase impliquée dans la résistance aux aminoglycosides (Ainsa *et al.*, 1997).

➤ Résistance acquise

Contrairement aux autres bactéries pathogènes qui acquièrent en général leur résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de plasmides ou transposons portant des gènes de résistance, l'acquisition de résistance chez *M. tuberculosis* provient, presque toujours, d'altérations spontanées de gènes chromosomiques spécifiques sous la forme de mutations ponctuelles non-synonymes, de délétions ou insertions (Davies, 1998). En effet, jusqu'à présent, aucun plasmide ou transposon de résistance n'a été décrit chez les mycobactéries (Veziris *et al.*, 2005). Par conséquent, la résistance n'est pas transférable entre les mycobactéries présentes chez un même patient, mais elle se transmet à toute la descendance de la bactérie mutée.

*b- Résistance primaire et secondaire*

Une bactérie tuberculeuse résistante isolée d'un patient qui n'a jamais été traité pour une tuberculose auparavant, est considérée comme une souche de « *résistance primaire* ». Par contre, une bactérie tuberculeuse résistante provenant d'un patient traité précédemment pour une tuberculose (pendant au moins un mois), est probablement une mycobactérie mutante résistante apparue chez ce patient et est alors considérée comme une souche de « *résistance secondaire* » (WHO, 1997)

*c-Résistance multiple*

Une tendance alarmante et une source croissante d'inquiétude pour la santé publique résident dans l'émergence de souches résistantes à plusieurs antibiotiques (Chan et Iseman, 2008). Les souches multi-résistantes ou **MDR** pour « **multiple drug-resistant** » se définissent comme des bacilles tuberculeux résistants au moins à l'isoniazide et la rifampicine, les deux agents anti-tuberculeux les plus puissants (Iseman et Madsen, 1989, Varelzdis *et al.*, 1994). Jusqu'à présent, aucune mutation spécifique conférant une multirésistance n'a été décrite. Les souches responsables de MDR-TB sont le résultat d'une accumulation séquentielle de mutations indépendantes, conférant chacune une résistance à un antibiotique différent (Ramaswamy et Musser, 1998).

Depuis quelques années, l'apparition dans le monde entier de souches **XDR** (« **extensively drug-resistant** ») est devenue préoccupante (Shah *et al.*, 2007 ; Jain et Dixit, 2008). Après plusieurs essais de définition assez confuses, celle adoptée est la suivante : il s'agit de bacilles tuberculeux résistants à au moins l'isoniazide, la rifampicine, une fluoroquinolone et un antibiotique injectable (amikacine, kanamycine ou capréomycine) (Jassal et Bishai, 2009 ; CDC, 2006).

### **IV-3- Mécanismes de résistance aux antituberculeux**

#### **IV-3-1- Mécanismes de résistance aux antibiotiques de première ligne**

##### *a-Isoniazide*

L'isoniazide nécessite d'être activée par une catalase peroxydase (codée par le gène *katG*) pour être efficace. Une fois activée, elle inhibe alors la synthèse des acides mycoliques de la paroi en interagissant avec l'enzyme enoyl-ACP réductase codée par le gène *inhA*, et favorise ainsi l'accumulation de radicaux libres par la bactérie. Les mutations ponctuelles du gène *katG*, en empêchant l'activation de l'INH, sont un mécanisme principal de résistance à cet antibiotique et concernent de 50 à 95% des souches résistantes à INH (**Zhang et Yew, 2009**). Bien que de nombreuses mutations aient été décrites pour le gène *katG* (**Slayden et Barry, 2000 ; Vilcheze et Jacobs, 2007**), c'est la mutation du codon 315 qui prédomine avec une occurrence comprise entre 60 et plus de 90% des souches résistantes à l'INH (**Marttila et al., 1998 ; Marttila et al., 1996 ; Mokrousov et al., 2002 ; Musser et al., 1996**) (**Tableau 2**). Certains autres gènes de résistance ont été identifiés, tels que *inhA*, *ahpC*, *kasA*, *ndh*, *efpA* ou encore la région promotrice de l'opéron *mabA/inhA*, notamment la mutation -15C/T, et la région promotrice du gène *ahpC* (**Basso et al., 1998 ; Hazbon et al., 2006 ; Musser et al., 1996 ; Ramaswamy et Musser 1998 ; Ramaswamy et al., 2003 ; Sherman et al., 1996 ; Sreevatsan et al., 1997 ; Vilcheze et Jacobs, 2007 ; Zhang et al., 1992**).

##### *b- Rifampicine*

L'essentiel de la résistance à RIF est associé à des mutations ponctuelles intervenant dans une région cible de 81 paires de bases (pb) ou région RRD (RIF Resistance Determining) du gène *rpoB* codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (**Zhang et Telenti, 2000**) (**Tableau 2**). En effet, plus de 95% des souches résistantes à RIF montrent une mutation dans cette région RRD (**Telenti et al., 1993 ; Zhang et al., 1992**). Les mutations les plus fréquentes interviennent au niveau des codons 531, 526 et 516 et sont généralement associées à de hauts niveaux de résistance tandis que celles intervenant au niveau des codons 511, 516, 518, et 522, ont été associées à de faibles niveaux de résistance (**Zhang et Young, 1994**).

*c-Éthambutol*

Les mutations de l'opéron *embCAB*, codant pour une arabinosyl transférase impliquée dans la synthèse d'arabinogalactane, sont les principaux mécanismes actuellement identifiés de résistance à EMB, notamment la mutation du codon 306 d'*embB* (**Sreevatsan et al., 1997 ; Telenti et al., 1997**) (**Tableau 2**). Cette mutation a, en effet, été retrouvée chez 47 à 68% des souches de *M. tuberculosis* présentant de forts taux de résistance à EMB ( **Sreevatsan et al., 1997 ; Telenti et al., 1997 ; Zhang et Telenti, 2000**). Cependant chez 25 à 35% des souches présentant une faible résistance à EMB aucune résistance n'a pu être détectée au sein de l'opéron *embCAB*, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de résistance ( **Alcaide et al., 1997 ; Telenti et al., 1997**).

*d-Pyrazinamide*

La PZA, un analogue de la nicotinamide, est une pro-drogue nécessitant d'être convertie par une pyranizamidase en acide pyrazinoïque pour être effective (**Kono et al., 1967**). Cet antibiotique est actif sur les bacilles tuberculeux semi-dormants ou persistants, et son inclusion au traitement de première ligne de la tuberculose a ainsi permis d'en réduire la durée à 6 mois ( **Davies et al., 2000 ; Wade et al., 2004 ; Zhang et Mitchison, 2003**). Pléthore de mutations du gène *pncA*, codant pour la pyrazinamidase, a été associée à la résistance à PZA, ce qui complique notablement la mise au point de tests de détection de résistance à cet antibiotique (**Sreevatsan et al., 1997**)(**Tableau 2**). On estime qu'entre 72% et 97% des souches résistantes à PZA présentent au moins une mutation du gène *pncA* réparties sur l'ensemble du gène et de sa région promotrice (**Louw et al., 2006 ; Portugal et al., 2004 ; Scorpio et al., 1997 ; Zhang et Yew, 2009**).

**Tableau 2:** Gènes de résistance des bactéries du complexe *M. tuberculosis* et principales mutations identifiées (Millet, 2011)

Antibiotique	Gène cible	Fonction du gene	Position des mutations les plus fréquemment détectées
<b>Antibiotiques de première ligne</b>			
<b>INH</b>	KatG	Catalase peroxydase	S315T
	inhA	Enoyl-ACP réductase	-15C/T -16A/G -8T/C -8T/A
<b>RIF</b>	rpoB	Sous-unité $\beta$ de l'ARN polymérase	C531T C531G C526T C526G A526G AC526TG T511C T511G C511G A516T G516T A518C C522T
<b>EMB</b>	embB	Arabinosyltransférase	G306A G306C G306T
<b>PZA</b>	pncA	Amidase	ND
<b>Antibiotiques de deuxième ligne</b>			
<b>SM</b>	rpsL	Protéine ribosomale S12	A43G A88G
<b>AMK/KM</b>	rrs	ARN 16S	ND
	rrs	ARN 16S	A1401G C1402T G1484T
<b>CPM</b>	Rrs	ARN 16S	A1401G C1402T G1484T
<b>FQ</b>	tlyA	Méthyltransférase	ND
	gyrA	Sous-unité $\alpha$ de l'ADN gyrase	A94G A94C
<b>ETH</b>	gyrB	Sous-unité $\alpha$ de l'ADN gyrase	A510C
	inhA	Enoyl-ACP réductase	ND
	ethA	Mono-oxygénase	ND

#### IV-3-2-Mécanismes de résistance aux antibiotiques de deuxième ligne

Des mutations au niveau des gènes *rpsL* et *rrs* codant respectivement pour les protéines ribosomales S12 et 16SrRNA constituent l'essentiel des mécanismes de résistance à SM. Elles sont retrouvées chez 50% et 20% des souches résistantes à SM (**Finken *et al.*, 1993 ; Honoré et Cole, 1994 ; Nair *et al.*, 1993 ; Zhang et Telenti, 2000** ). Les résistances à AMK et KM sont associées à des mutations au niveau des codons 1401, 1402 et 1484 du gène *rrs* tandis que la résistance à CPM a été associée à des mutations des gènes *rrs* et *tlyA* (**Maus *et al.*, 2005**).

Les fluoroquinolones (FQ) agissent en inhibant l'ADN gyrase des mycobactéries (**Zhang et Yew, 2009**). Les mutations des codons 74, 83, 87, 88, 90, 91, 94 au sein d'une région QRD (Quinolones Resistance Determinant) du gène *gyrA* ont été identifiées comme majeures dans le phénomène de résistance des bacilles tuberculeux aux fluoroquinolones (**Alangaden *et al.*, 1995 ; Cheng *et al.*, 2004 ; Perdigao *et al.*, 2009 ; Ramaswamy et Musser 1998 ; Sun *et al.*, 2008 ; Takiff *et al.*, 1994**). Des mutations au sein du gène *gyrB* ont aussi été identifiées mais ne semblent pas conférer à elles seules une résistance aux FQ, elles pourraient compléter les mutations en *gyrA* et permettre à la bactérie de développer de hauts niveaux de résistance aux FQ.

L'éthionamide (ETH), de même que l'INH, agit en inhibant la production d'acides mycoliques, indispensables à la construction de la paroi de *M. tuberculosis* (**Banerjee *et al.*, 1994**). Les mutations du gène *inhA* et de sa région promotrice confèrent à la fois une résistance à ETH et à INH tandis que les mutations du gène *ethA* confèrent une résistance à ETH et autres thioamides (**Baulard *et al.*, 2000 ; DeBerber *et al.*, 2000 ; Morlock *et al.*, 2003**).

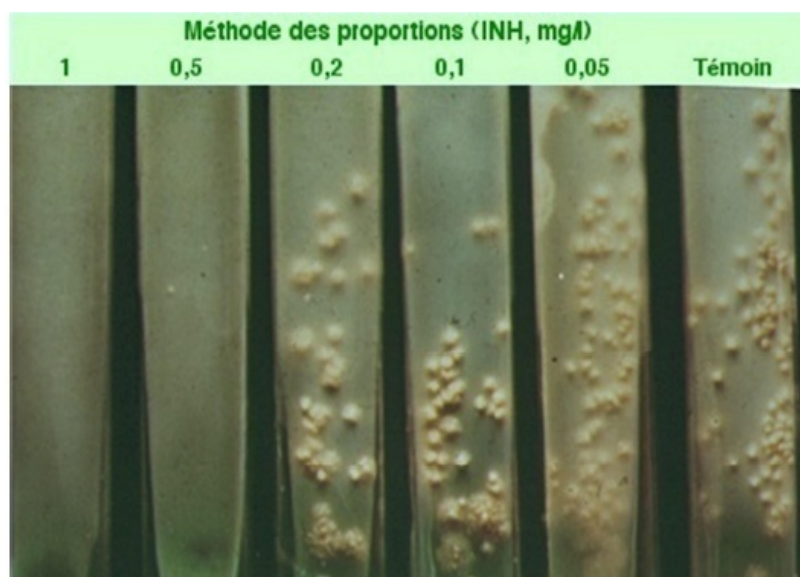
#### IV-4- Détection des résistances aux antituberculeux de *Mycobacterium tuberculosis*

On peut distinguer deux types et donc deux méthodes de détermination des résistances aux antituberculeux des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*: une résistance phénotypique et une résistance génétique.

##### IV-4-1- Méthodes phénotypiques : l'antibiogramme

La méthode des proportions (**Figure 15**) est la méthode de référence pour la détermination de la résistance phénotypique des bactéries du complexe *M. tuberculosis* aux antituberculeux (**Mitchison, 1984**). Elle s'effectue généralement sur milieu de culture solide contenant les

antibiotiques à tester, par inoculation d'une suspension bactérienne et comparaison de la croissance bactérienne avec un milieu de culture sans antibiotique. Une souche sera déclarée résistante à l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la streptomycine (SM) ou l'éthambutol (EMB), si la proportion de bacilles résistants, donc se développant sur milieu avec antibiotique, est supérieure à 1% de la population bacillaire totale. La lecture sera effectuée à partir du 21<sup>ème</sup> jour au 28<sup>ème</sup> jour. Une deuxième et dernière lecture sera faite au 40<sup>ème</sup> jour.



**Figure 15** : L'antibiogramme par méthode des proportions (Ouardi, 2013)

Il est aussi possible de déterminer la résistance phénotypique des bacilles du complexe *M. tuberculosis* sur milieu de culture liquide (type Bactec 460TB et MGIT, Becton Dickinson) en y ajoutant l'antibiotique à tester à la concentration critique (ou concentration définie comme étant la plus faible concentration minimale inhibitrice, CMI, permettant de différencier les souches résistantes des souches sensibles). L'étude phénotypique en milieu liquide permet de raccourcir le délai de réponse par rapport à la méthode en milieu solide et fournit des résultats fiables plus rapidement (5 à 10 jours) (Martin *et al.*, 2007). Les antibiotiques couramment testés par ces méthodes phénotypiques sont l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, le pyrazinamide et la streptomycine (Inderlied et Salfinger, 2001).



#### **IV-4-2- Méthodes moléculaires**

La détection de la résistance génétique aux antituberculeux implique la mise en évidence de mutations au niveau de la séquence de gènes codant pour la cible des principaux antibiotiques (**Tableau 2**). Différents outils de détection de ces mutations ont été mis au point, et se basent sur l'amplification par PCR puis l'hybridation inverse des produits de PCR avec une sonde préalablement fixée sur une bandelette (INNOLiPARif TB Assay, Innogenetics ; GenoTypeMTBDR Plus et GenoTypeMTBDRsl, HainLifescience), la real-time PCR (GeneXpert MTB/RIF Assay, Cepheid), le séquençage des gènes de résistance, ou encore les puces à ADN (**van Deun et al., 2010**).

##### *a- Hybridation moléculaire*

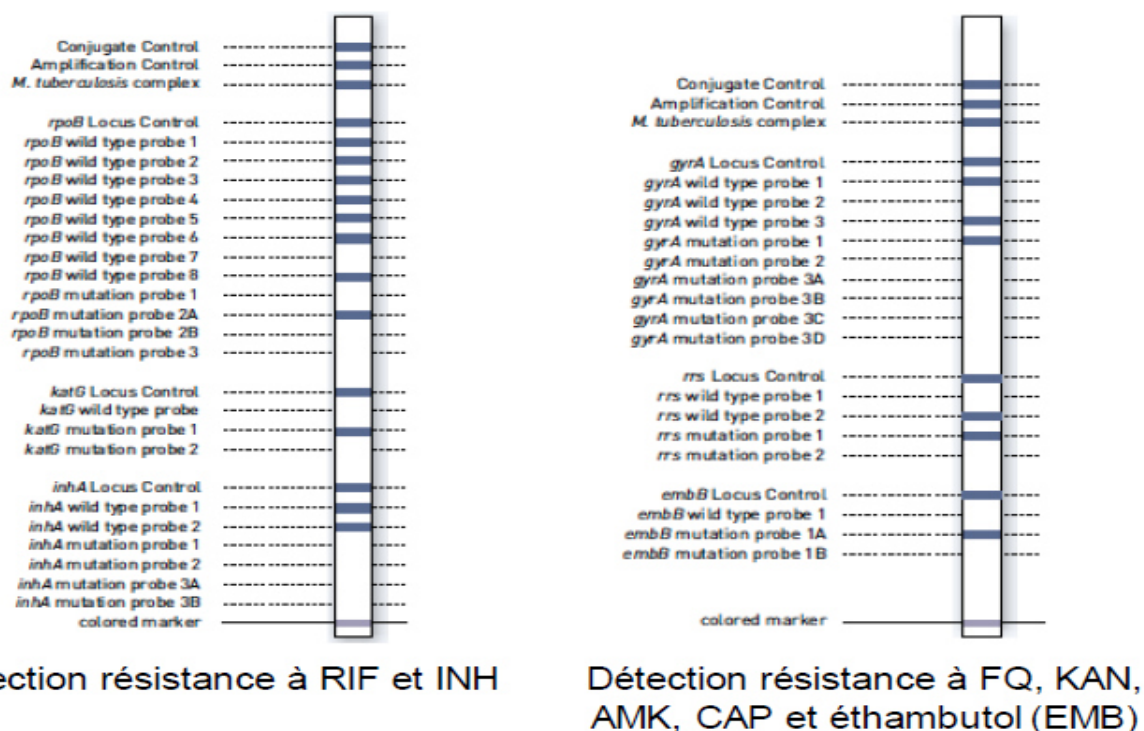
- Le test INNOLiPA Rif .TB Assay (Innogenetics):

La technique LiPA (Line Probe Assay) peut être utilisée. Un test est commercialisé pour la détection de la résistance à la RMP : le test **INNOLiPA Rif .TB** permet après amplification, l'identification du complexe *M.tuberculosis* et la détection simultanée d'une résistance à la rifampicine d'une mycobactérie du complexe tuberculosis cultivée sur milieu liquide ou solide. 95% des souches résistantes à la rifampicine possèdent une mutation du gène *rpobB*. Après hybridation des produits d'amplification du gène *rpobB*, la présence d'hybrides est révélée par une réaction colorimétrique (**Martin et al., 2007 ; Gerome et al., 2003**).

- Les tests GenoTypeMTBDRplus et GenoTypeMTBDRsl, HainLifescience

Le test GenoType MTBDR plus (**Figure 16**) permet l'identification du complexe *M. tuberculosis* et les résistances à la rifampicine et/ou à l'isoniazide à partir d'une culture ou de prélèvements pulmonaires présentant un examen direct positif. L'identification de la résistance à la rifampicine est réalisée par la détection des principales mutations au niveau du gène *rpobB*. L'identification de résistance à l'isoniazide est réalisée à travers l'analyse des gènes *katG* et *inhA* (**Patnaik et al., 2001**).

Le test GenoTypeMTBDRsl permet de détecter les résistances aux fluoroquinolones et/ou aux aminoglycosides et/ou à l'éthambutol.



**Figure 16 :** Bandelette GenoTypeMTBDR plus et GenoType MTBDRsl  
(Patnaik *et al.*, 2001).

### *b*-PCR en temps réel

La PCR en temps réel (ou qPCR pour quantitative PCR) a connu un essor considérable au cours de ces dernières années, sans doute en partie en raison de sa simplicité de mise en oeuvre, de son automatisation pour des applications d'analyses à grande échelle et de la publicité importante qui a été faite sur sa précision et sa sensibilité [22].

#### ➤ Principe de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel combine l'amplification avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent. La réaction d'amplification de la séquence ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique (dénaturation, hybridation, extension).

L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle (figure ...). La première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible (template) [8].

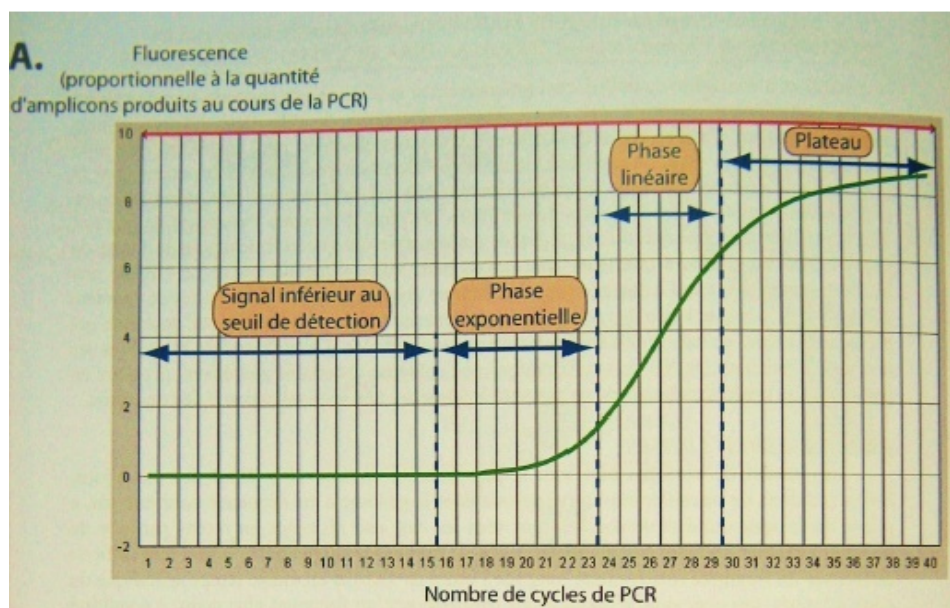


Figure .... : Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycles de PCR présentée en échelle linéaire [22]

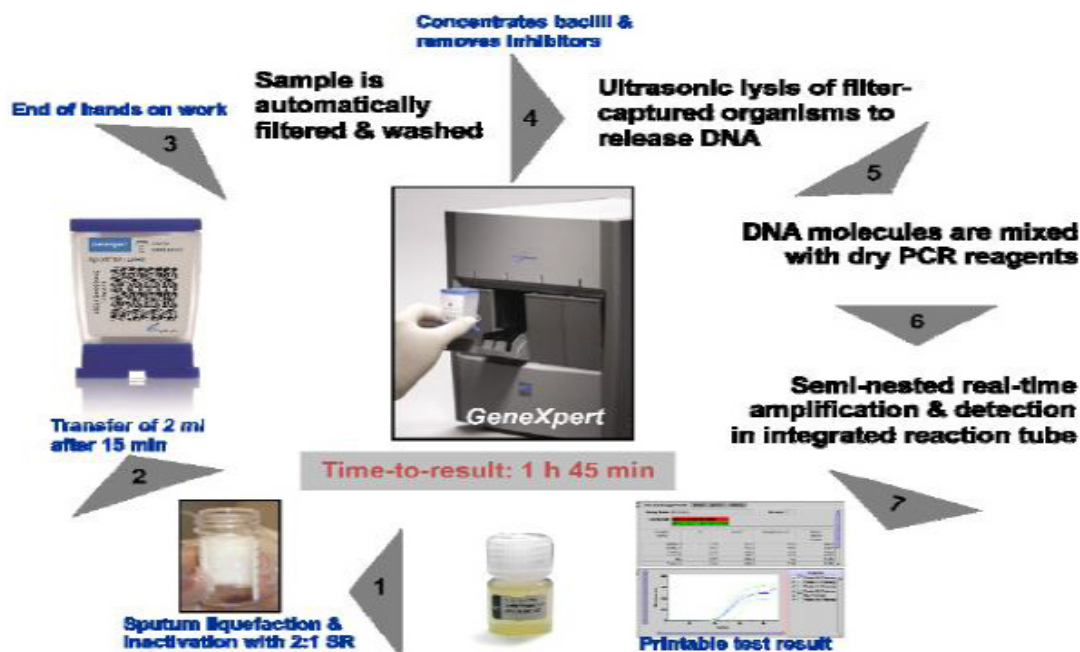
➤ **Avantages de la PCR en temps réel**

La PCR traditionnelle est seulement semi quantitative, elle ne peut pas être considérée comme une analyse quantitative et ses résultats sont habituellement exprimés en termes de positivité / négativité. Une évaluation semi-quantitative est possible sur la base de l'aspect de positivité (faible/forte) de bande électrophorétique, mais cette approche est fortement subjective et la sensibilité est très basse. La PCR en temps réel est une variante de la PCR standard. La méthode s'appelle « la PCR en temps réel » car l'ADN amplifié peut être détecté au cours du procédé PCR, en temps réel, plutôt qu'à la fin du procédé. Cela permet une mesure plus fiable et plus précise de l'acide nucléique. La réaction PCR en temps réel se déroule automatiquement sans intervention de l'opérateur, permettant d'accroître la productivité et de réduire la possibilité d'erreur humaine pour donner des résultats fiables et reproductibles.

De nouveaux outils de diagnostic de la tuberculose (TB) sont apparus ces dernières années. Un test automatisé d'identification des acides nucléiques, le Xpert® MTB/RIF (GeneXpert, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) (**Figure 17**) a été récemment élaboré et semble prometteur pour le diagnostic de la TB et la détection de la résistance à la rifampicine (RMP) (**Small et Pai, 2010 ; WHO, 2011**). Depuis l'approbation de ce test par le Strategicand Technical Advisory Group for TB (STAG-TB) en Septembre 2010, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fortement plaidé pour sa mise en œuvre rapide et sur une large échelle (**WHO, 2011**).

La spécificité du test MTB/RIF s'est avérée très élevée (97–100%) pour le diagnostic de la tuberculose dans des études de démonstration coordonnées par la Fondation pour les Nouveaux Diagnostics Innovateurs (FIND) (Boehme *et al.*, 2010 ; Boehme *et al.*, 2011). La sensibilité est différente selon que les patients atteints de TB pulmonaire ont une expectoration positive à l'examen microscopique direct des frottis et à la culture, ou positifs uniquement à la culture. Si on prend la culture comme référence, la sensibilité est supérieure à 95% pour les échantillons dont l'examen direct des frottis de crachats est positif et varie entre 65% et 77% en cas d'examen microscopique négatif (Boehme *et al.*, 2010 ; Moure *et al.*, 2011), avec un gain de sensibilité supplémentaire lorsque le nombre de tests passe de un à trois. Le test MTB/RIF est cependant beaucoup plus sensible que l'examen microscopique des frottis de crachats pour détecter les tuberculoses pulmonaires à culture positive. Ceci est particulièrement important chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Le STAG-TB a soutenu les observations du Groupe d'Experts de l'OMS (WHO, 2011) en affirmant que le test MTB/RIF devrait être utilisé comme test initial de diagnostic chez les individus suspects de souffrir d'une TB-MDR ou d'une TB associée au VIH.



**Figure 17:** Méthode du test Xpert MTB/RIF (Francis, 2011).

**Traduction de la figure 17 :**

1. Liquéfaction des expectorations et inactivation avec le réactif dans un rapport de 2/1
2. Transfert de 2 ml après 15 minutes
3. Fin des manipulations
- Filtration et rinçage automatiques de l'échantillon
4. Concentration des bacilles et élimination des inhibiteurs
- Lyse par ultrasons des micro-organismes capturés sur le filtre pour libérer l'ADN
5. Mélange des molécules d'ADN avec les réactifs lyophilisés pour la PCR
6. Amplification semi-nichée en temps réel et détection dans le tube à essai intégré
7. Résultats du test imprimables

Le test Xpert MTB/RIF se fonde sur une PCR semi-nichée en temps réel amplifiant le gène cible *rpoB*. Les balises moléculaires utilisant de nouveaux fluorophores et des inhibiteurs sont employées pour détecter l'hybridation de chacune des cinq régions ciblées amplifiées du gène (**Figure 18**). *Bacillus globigii*, un micro-organisme sporogène du sol est utilisé comme témoin pour l'ensemble du processus, servant de contrôle de la qualité pour le piégeage des bactéries, la lyse bactérienne, l'extraction de l'ADN, l'amplification et la détection de la sonde.



**Figure 18** : schéma représentatif de la séquence alignée du gène *rpoB* (RIF Resistance Determining Region) (**Francis, 2011**).

Le test Xpert MTB/RIF a été conçu pour être robuste et facile d'emploi. Les cartouches et le réactif doivent être conservés à 2-28 C° suivant les recommandations du fabricant. Les cartouches sont préchargées avec tous les réactifs nécessaires pour le traitement de l'échantillon, l'extraction de l'ADN, l'amplification et la détection au laser de l'amplicon ciblé fixé sur les balises moléculaires. La température ambiante maximale pour le fonctionnement de l'instrument GeneXpert est actuellement limitée à 30°C.

➤ **Balises moléculaires**

Une balise moléculaire est une sonde d'hybridation d'ADN en forme d'épingle à cheveux. En dessous de la température d'hybridation la molécule se trouve en position fermée, le quencher se trouve proche du reporter et aucune fluorescence n'est détectée. Si la balise moléculaire s'associe au produit de PCR ou est détruit, le quencher est éloigné du reporter et

la fluorescence peut être mesurée (Annexe 1). Ce type de sonde augmente grandement la spécificité de l'hybridation [8]. La spécificité de cette technologie est telle qu'elle permet de détecter les différences de séquences au nucléotide près, ce qui peut être parfois difficile à réaliser avec les technologies de sondes linéaires. Elle constitue donc une technologie efficace pour la détection et le criblage à grande échelle des SNPs (single nucleotide polymorphisms) [5]. La principale difficulté de ces sondes réside dans le design crucial de la boucle. Cette sonde ADN n'émet de la fluorescence qu'en présence de nombreuses copies amplifiées de l'ADN cible qui vont provoquer la déformation de sa structure.

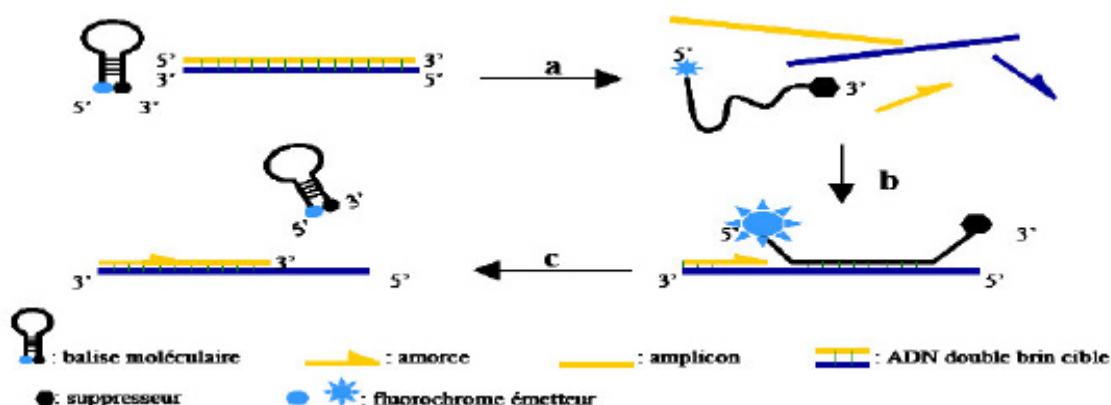


Figure .....: Balises moléculaires [8]

- (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence.
- (b) Lorsque la sonde s'hybride à sa séquence cible, le fluorochrome émetteur est suffisamment éloigné de son suppresseur pour permettre l'émission de fluorescence.
- (c) À l'étape de polymérisation, la balise moléculaire retourne en solution sous forme d'épingle à cheveux.

### c- Le séquençage

Le séquençage des gènes de résistance reste la méthode moléculaire la plus fiable puisqu'elle permet d'identifier l'ensemble des mutations au sein des gènes étudiés et de détecter les mutations silencieuses ou synonymes ne conférant a priori pas de résistance à la bactérie (**van Deun et al., 2010**). Une souche sera déclarée multirésistante (MDR) si elle présente une résistance à la fois à INH et RIF, et extrêmement résistante (XDR) si en plus d'être MDR elle a développé une résistance à une fluoroquinolone quelle que soit, et à au moins un antituberculeux injectable sur les trois utilisés pour le traitement de la tuberculose (CPM, KAN, AMK) (**WHO, 2009**).

*d*-Polymorphisme de fragments de restriction RFLP

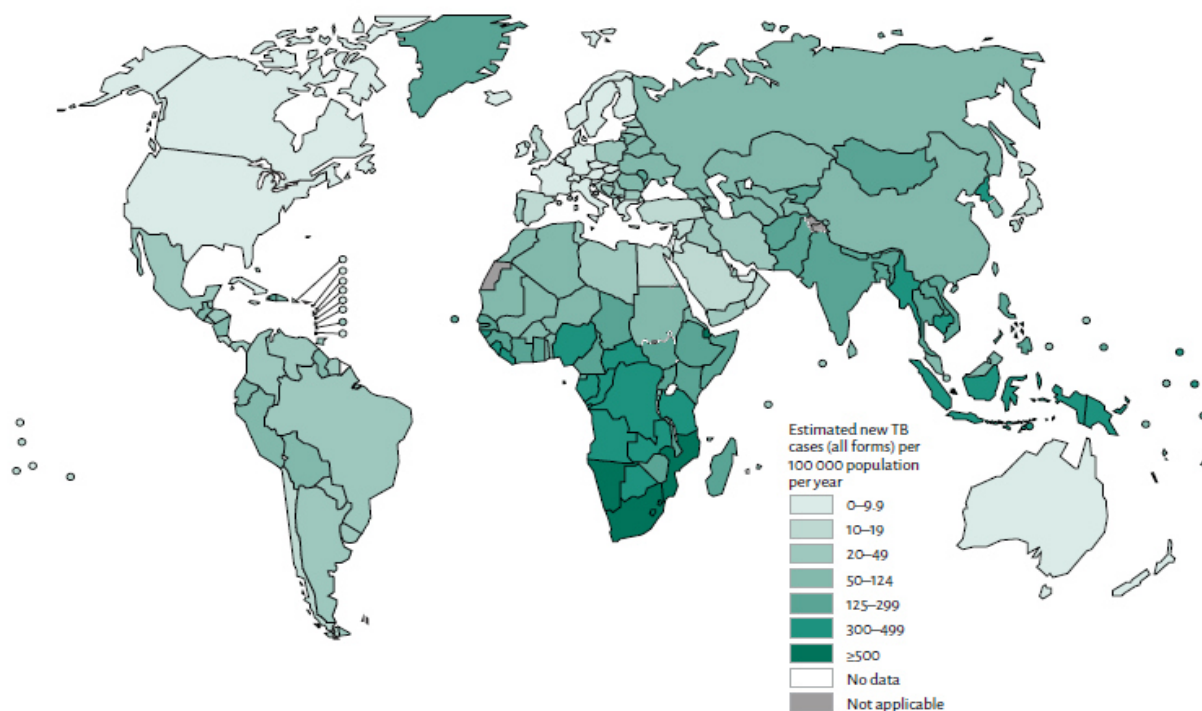
Le génome des mycobactéries présente des séquences d'insertion appelées « IS ». L'élément d'insertion le plus étudié est l'IS6110 (1365 pb), communément utilisé pour le génotypage des isolats tuberculeux (Thierry *et al.*, 1990). La technique repose sur l'analyse du nombre et de la position des copies d'IS6110, variables d'un isolat à l'autre et reflété par un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) après clivage de l'ADN génomique au moyen de l'enzyme PvuII. La technique IS6110-RFLP standardisée est actuellement la méthode de référence pour le typage des isolats du complexe *M. tuberculosis* (van Embden *et al.*, 1993).

## **V- Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux**

### **V-1- La tuberculose et la résistance aux antituberculeux dans le monde**

La tuberculose est l'une des maladies la plus meurtrière au monde ; elle se situe en seconde position juste après le VIH/SIDA. (WHO, 2011). En 2014, il était estimé à 9,6 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose : 5,4 millions chez les hommes, 3,2 millions chez les femmes et 1,0 millions chez les enfants, et 1,4 millions de décès (1,1 million entre les personnes séronégatives et 0,4 million chez les personnes séropositives), dont environ 890 000 étaient des hommes, 480 000 étaient des femmes et 140 000 enfants. La figure 19 montre l'estimation des nouveaux cas de tuberculose pour 100 000 habitants en 2014 (WHO, 2015).

Estimated TB incidence rates, 2014



**Figure 19** : Taux d'incidence de la tuberculose dans le monde en 2014.  
(Source WHO 2015)

Tous les pays sont touchés mais la plupart des cas (58%) se produisent en Sud-est de l'Asie et la région du Pacifique occidental. L'Afrique comptait 28 % des cas de tuberculose dans le monde en 2014 avec une incidence de 281/100 000 de population et une moyenne plus du double de la moyenne mondiale (133/100000 population). L'Inde, l'Indonésie et la Chine comptaient à elles seules le plus grand nombre de cas avec 23%, 10 % et 10% du total mondial, respectivement.

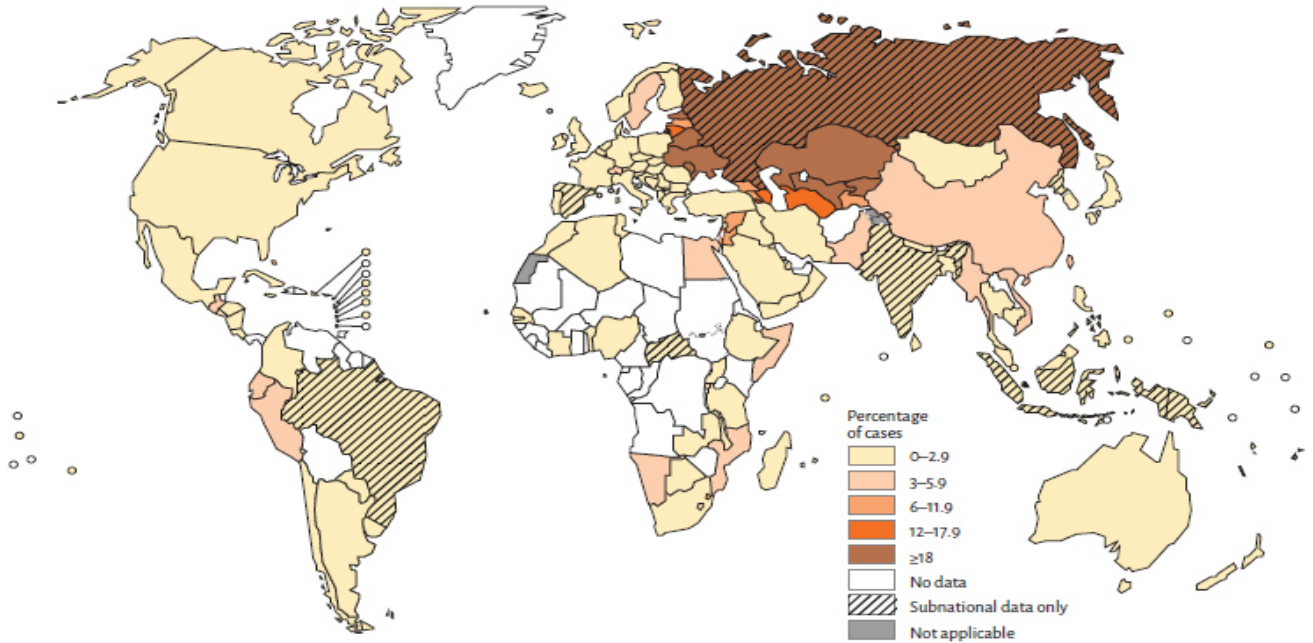
Environ 3,3% des nouveaux cas de tuberculose dans le monde sont dus à des souches multirésistantes. La proportion est bien plus grande chez les patients déjà traités et atteint 20% environ (**Figure 20**). La fréquence de la TB-MDR varie sensiblement d'un pays à l'autre. En 2014, 190 000 personnes étaient estimées décédées de la tuberculose multirésistante. L'OMS estimait à 0,3 million environ le nombre de cas de TB -MR dans le monde en 2014. Environ 54 % des cas étaient concentrés en Chine, en Fédération de Russie et en Inde. Le nombre de cas de TB -MDR détectés et diagnostiqués augmente grâce aux tests de diagnostic rapide mis en place en 2012. Globalement, seulement 50% des patients TB-MDR ont été traités avec succès (**WHO, 2015**). Quelque 9.7 % des cas de TB-MDR sont aussi résistants à



deux autres classes de médicaments. On parle alors de tuberculose ultrarésistante (TB-XDR) (WHO, 2015).

**FIGURE 4.2**

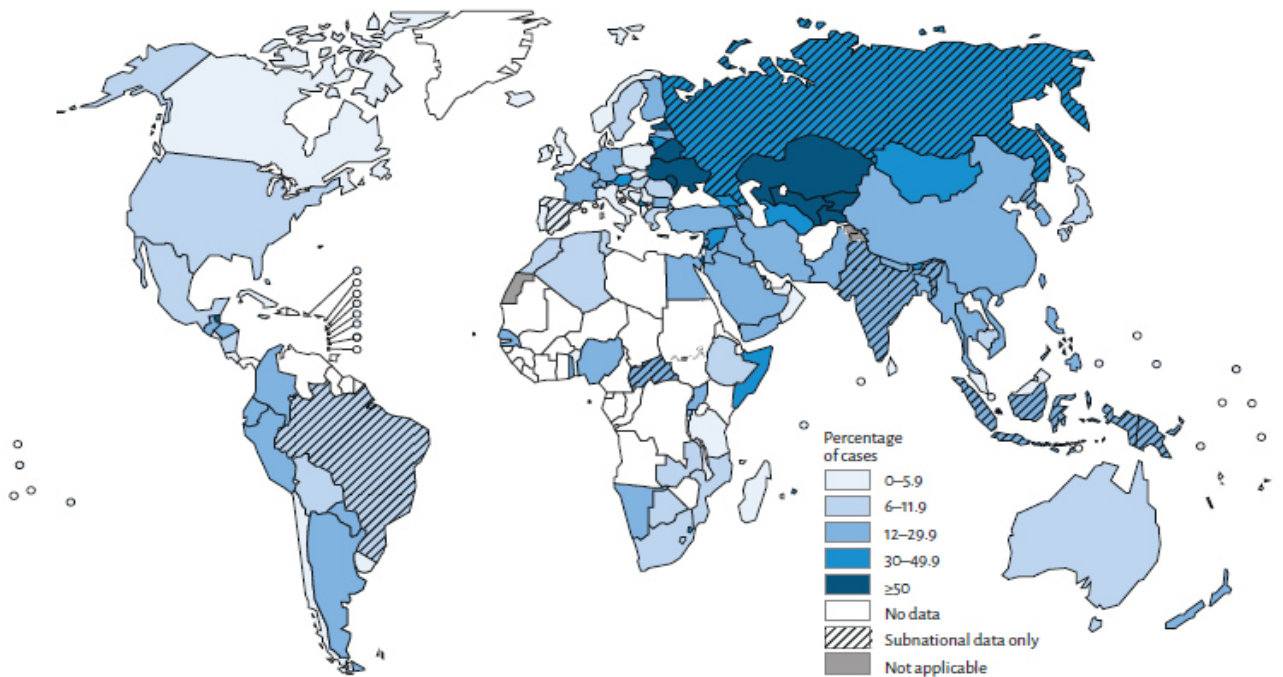
Percentage of new TB cases with MDR-TB<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Figures are based on the most recent year for which data have been reported, which varies among countries. Data reported before the year 2000 are not shown.

**FIGURE 4.3**

Percentage of previously treated TB cases with MDR-TB<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Figures are based on the most recent year for which data have been reported, which varies among countries. Data reported before the year 2000 are not shown. In six countries or territories, the high percentages of previously treated cases with MDR-TB refer to only a small number (1-8) of notified TB cases. These are: Bahrain; Belize; Bonaire, Saint Eustatius and Saba; Cyprus; Israel; and Sao Tomé and Príncipe.

Figure 20 : Prévalence de la TB-MDR parmi les nouveaux cas et les cas déjà traités de tuberculose dans le monde en 2014. (WHO,2015).

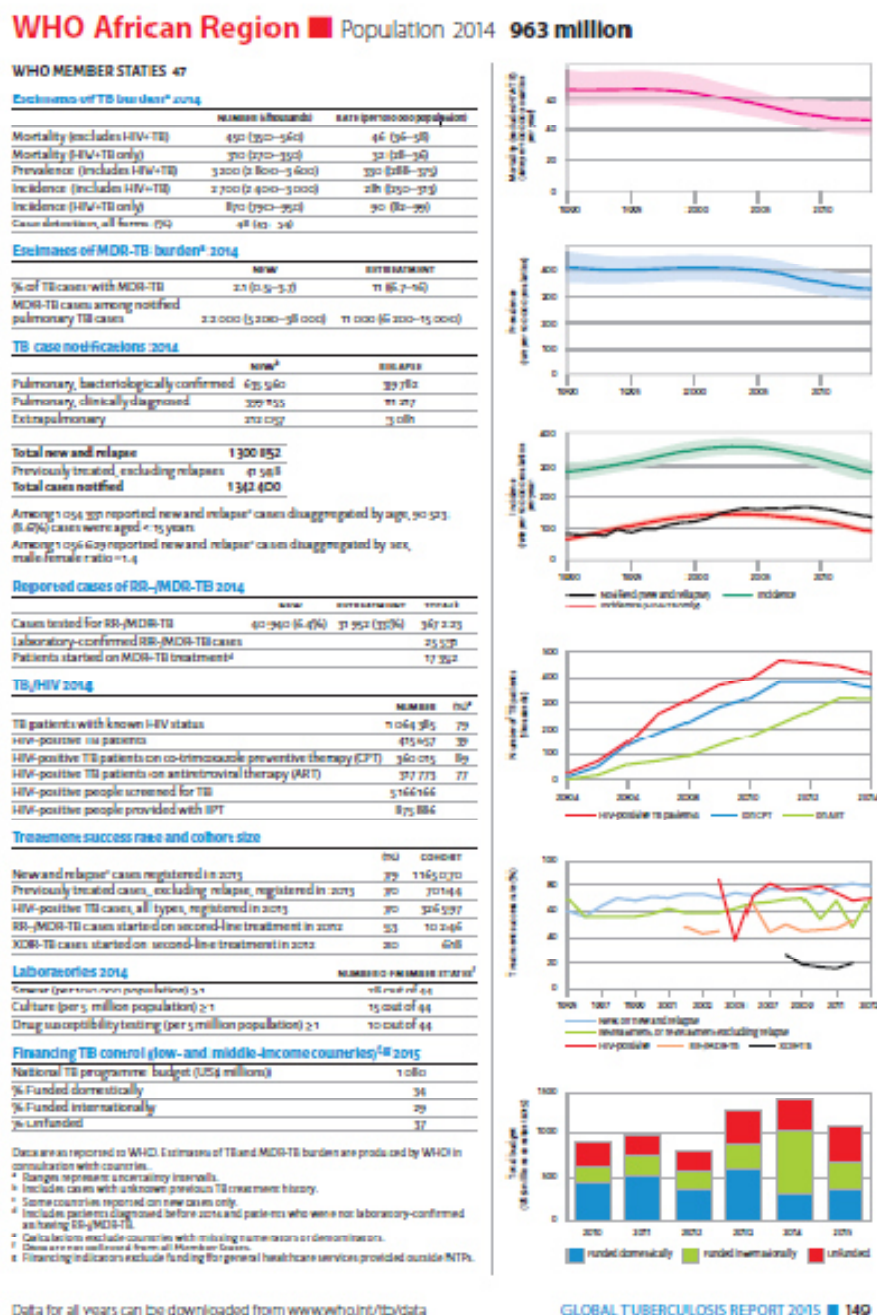
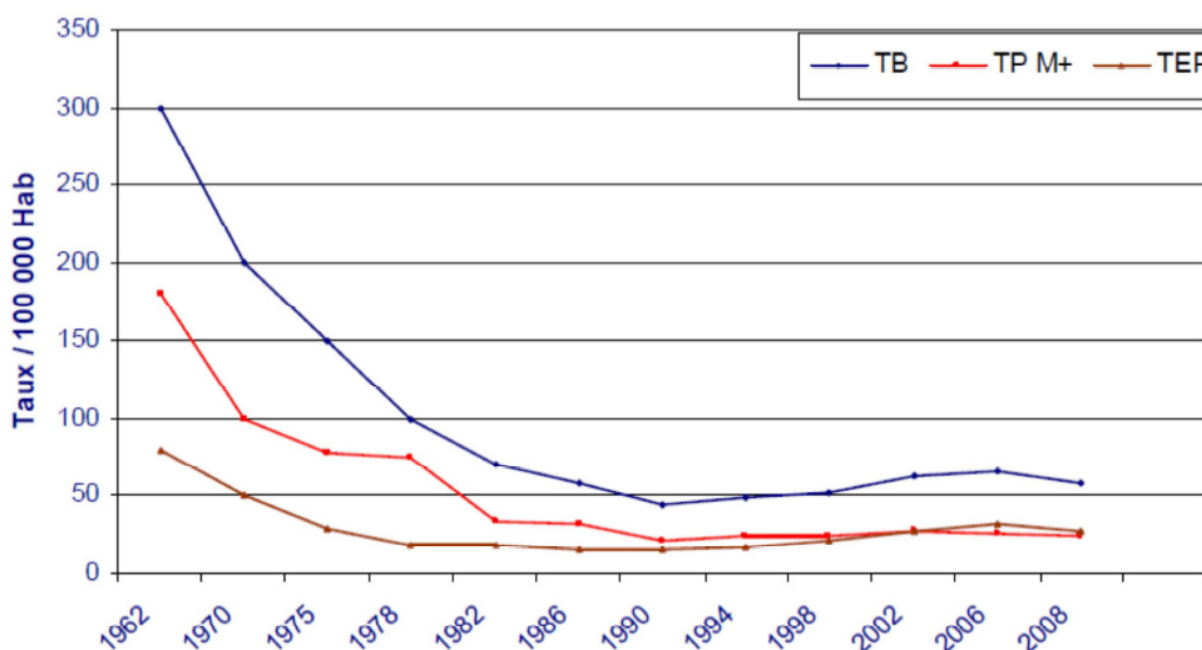


Figure 21 : La tuberculose en Afrique en 2014 (WHO 2015).

## V-2- La tuberculose et la résistance aux antituberculeux en Algérie

Au cours de la période 1962-2010, l'Algérie, jadis pays à haute prévalence de tuberculose, a rejoint depuis le début des années 1980 le groupe des pays à prévalence modérée, où l'incidence annuelle de la tuberculose toutes formes se situe entre 20 et 99 cas pour 100.000 habitants (**Manuel de lutte antituberculeuse, 2011**).

Au plan national, la surveillance épidémiologique a permis de constater que le taux de tuberculose pulmonaire a diminué depuis l'indépendance pour se stabiliser ensuite jusqu'à 1996 où il a connu une légère augmentation (**Ouardi, 2013**).



**Figure 22 :** Incidence de la tuberculose en Algérie de 1962 à 2008 (**Ouardi, 2013**).

Au niveau mondial, le nombre de cas de tuberculose est resté stable ou en diminution. Néanmoins, en raison de la croissance démographique, le nombre absolu de nouveaux cas continu d'augmenter (**WHO, 2008**). En Algérie, 78 cas pour 100000 habitants ont été recensés en 2014 (**WHO, 2015**).

La prévalence de la résistance bactérienne aux antituberculeux chez les malades jamais traités auparavant (ou résistance primaire) est l'indice épidémiologique qui reflète la qualité de la chimiothérapie appliquée dans un programme national.

- La prévalence de la résistance primaire a été régulièrement surveillée dans la région, d'Alger de 1965 à 2010. Elle était de 15 % dans la période 1965-1970 et elle est passée à 3,4% en

2010. Elle a été de 8,2% en 1980 et de 4,5 % en 1997 au cours de deux enquêtes prospectives menées à 17 ans d'intervalle. Dans la moitié des cas, elle concernait la streptomycine et n'a eu de ce fait qu'une influence limitée sur les résultats du traitement standardisé appliqué.

- Au niveau national, deux enquêtes prospectives ont été menées sur des échantillons représentatifs de malades, respectivement en 1988 et 2002 (**Tableau 3**), soit 8 ans et 22 ans après l'introduction de la rifampicine sous forme associée dans les régimes de chimiothérapie de première ligne. La prévalence de la résistance primaire était égale à 8.6 % en 1988 (dont 1,2% due à une résistance primaire à l'isoniazide et à la rifampicine) et à 5,9 % en 2002 (dont 1,4% due à une résistance primaire à l'isoniazide et à la rifampicine). La généralisation des régimes de chimiothérapie de courte durée dans le traitement des malades depuis 1980 a donc contribué à réduire la prévalence de la résistance primaire et à maintenir la prévalence de la multi résistance primaire (à l'isoniazide et à la rifampicine) au-dessous du seuil critique de 3% fixé par l'OMS (**Manuel de lutte antituberculeuse, 2011**).

**Tableau 3 : Prévalence de la résistance primaire au cours de deux enquêtes nationales prospectives (Manuel de lutte antituberculeuse, 2011)**

Cas testés (nombre)		Souches résistantes			
		A un médicament au moins		Multirésistantes	
		Nombre	%	Nombre	%
1988	243	21	<b>8.6</b>	3	<b>1.2</b>
2002	574	34	<b>5.9</b>	8	<b>1.4</b>

Selon le rapport de l'OMS de 2014, en Algérie la TB-MR a été estimée à 1,4 (0,6 – 2,7 %) des nouveaux cas et 9,1 % (1,1% - 29 %) des cas déjà traités pour tuberculose (**OMS, 2015**).

### Algeria

Tuberculosis 2014		TB cases	
Incidence of TB cases** (2014)	Number (prevalence)	Rate (per 100 000 population)	
Multidrug-resistant (MDR)-TB	44 (0.1-0.1)	31 (0.8-1.0)	
Mortality (HIV+TB only)	0 (0.0) (0.0-0.0)	0 (0.0-0.0)	
Prevalence (HIV+TB)	46 (0.1-0.1)	33 (0.8-1.0)	
Prevalence (prevalence ratio)††	76 (0.2-0.2)	56 (1.4-1.6)	
Prevalence (ratio to ratio)	0.7 (0.1-0.1)	0.7 (0.1-0.1)	
<b>Case detection, TB cases (%)</b>			
74 (0.0-0.0)			
<b>Estimation of MDR-TB burden** 2014</b>			
% of TB cases with MDR-TB	Item	Relative (95% CI)	
MDR-TB cases among notified pulmonary TB cases	100 (81-100)	81 (6-100)	
<b>Tuberculosis cases</b>			
	Year 2000	Year 2014	
Pulmonary, biologically confirmed	7 000	334	
Pulmonary, clinically diagnosed	1 000	0	
Extrapulmonary	13 700	0	
<b>Some key TB statistics</b>			
Prevalence notified, multidrug-resistant	0%		
Total cases notified	22 700		
<b>Among HIV non-cases</b>			
72 (76%) cases aged under 15 years, male:female ratio 1:8			
<b>Estimated success of HIV-MDR-TB 2014</b>			
	New	Relative (95% CI)	Total**
Cases notified for HIV-MDR-TB	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0)
Laboratory confirmed HIV-MDR-TB cases	46		46
<b>FOUR NOTIFIED HIV-MDR-TB CASES***</b>			<b>0</b>
<b>TREATMENT</b>			
	Number	(%)	
TB patients with known HIV status			
Unknown HIV status			
HIV-positive TB patients on successful treatment with first-line (new) ART			
HIV-positive TB patients on successful treatment with second-line (ART)			
HIV-positive people notified for TB	4 000		
HIV-positive people notified with TB			
<b>Treatment success rate and default rate</b>			
	(%)	Global	
New and relapse cases registered in 2013	(26)	7 000	
Successfully treated cases, among relapse, registered in 2013	(74)	1 911	
HIV-positive TB cases, all cases, notified in 2012			
HIV-MDR-TB cases, notified in successful treatment in 2012			
MDR-TB cases started on second-line treatment in 2012			
<b>Indicators 2014</b>			
Gender Gap 100 000 population†	0.4		
Culture Gap 8 million population†	0.3		
Long short-course testing (per 10 million population)	0.1		
Bliss performing (per 10 million population)	0.1		
<b>Is tuberculosis now a major cause of death and disability?</b>	Yes, it is/was/will		
<b>Financing TB control</b>			
National TB programme budget (US\$ million)			
% Donor contribution			
% Funded internationally			
% Unfunded			
* Patients estimated according to formula			
** Success rate with unknown prevalence (in treatment survey)			
*** Notified patients (diagnosis based) (with and without known HIV status) and patients with known HIV status (diagnosis confirmed) are having unknown HIV status			

Data are sourced to WHO. Estimates of TB and MDR-TB burden are produced by WHO in consultation with countries.

### Tuberculosis profile

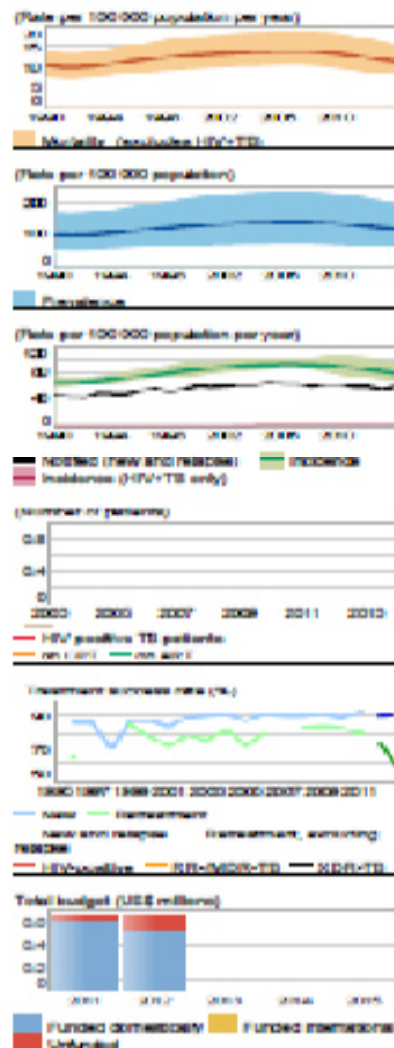


Figure 23: La tuberculose en Algérie en 2014. (WHO 2015)

*Matériel  
et méthodes*

## **I- Objectifs :**

La tuberculose multirésistante (TB-MDR) est définie par la perte de sensibilité des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* aux deux majeurs antituberculeux: l'isoniazide (H) et la rifampicine (R). Cette résistance peut être acquise ou primaire. En Algérie, la prévalence de la résistance primaire constitue l'indice épidémiologique qui reflète la qualité de la chimiothérapie appliquée dans le programme national de la lutte antituberculeuse. Le diagnostic de certitude de la tuberculose reste la positivité des cultures. Ainsi la détection de la résistance aux antituberculeux est basée sur la technique de l'antibiogramme sur milieu solide par la méthode de proportion. On se référant à ces données, nous avons entrepris deux axes de recherches (épidémiologique et moléculaire) sur les tuberculeux multi résistants dans la région de l'Ouest Algérien. Ainsi notre travail de recherche a été subdivisé en deux parties :

**-Partie I : étude épidémiologique :** dont l'objectif était de décrire le profil épidémiologique, clinique, bactériologique, et même évolutif des tuberculeux multi-résistants dans l'Ouest Algérien.

**-Partie II : étude moléculaire :** dont les objectifs étaient :

-appliquer une technique moléculaire pour le diagnostic rapide de la tuberculose, ainsi que la détection de la résistance à la rifampicine ;

-déterminer la prévalence de TB-MDR parmi les cas positifs de tuberculose pulmonaire ;

-faire une étude comparative entre les techniques classiques (microscopie, culture et antibiogramme) et les techniques moléculaires (GeneXpert MTB/RIF).

## **II- Matériels et Méthodes :**

### **II-1- Partie épidémiologique :**

#### **II- 1-1-Type et durée de l'étude :**

Il s'agissait d'une étude analytique rétrospective allant de janvier 2010 jusqu'au décembre 2014 menée dans le service de pneumo-phtisiologie (B) du CHU d'Oran (l'Ouest Algérien).

#### **II-1-2-Population étudiée :**

Les patients inclus dans l'étude provenaient des différents services hospitaliers du CHU et de différents secteurs sanitaires publics de wilayas de l'Ouest Algérien.

**II-1-3- Critères d'inclusion:**

L'étude concernait les patients porteurs de tuberculose multirésistante confirmée par test de sensibilité aux antituberculeux et qui devaient résider dans l'Ouest Algérien. Toutes les tranches d'âge étaient concernées ainsi que les deux sexes.

**II-1-4- Paramètres analysés :**

Le recueil des données a été effectué à partir des dossiers médicaux. Les éléments recueillis étaient :

- L'âge,
- Le sexe,
- L'état civil,
- Le niveau socio-économique,
- Les habitudes toxiques,
- Les comorbidités,
- La localisation de tuberculose,
- Les antécédents familiaux de TB-MDR

Le traitement statistique et l'analyse des données ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS version 20.

**II-2-Partie moléculaire:**

**II- 2-1-Type et durée de l'étude :**

Une étude prospective a été menée dans le service de pneumo-phthiologie (B) du CHU d'Oran (l'Ouest Algérien) durant une période de 24 mois (Janvier 2013-Décembre 2014).

**II-2-2-Population étudiée :**

50 cas suspects de tuberculose multirésistante provenant de différents CHU et de différents secteurs sanitaires publics des wilayas de l'Ouest Algérien.

**II-2-3- Critères d'inclusion:**

Les critères d'inclusion utilisés pour les cas suspects de TB- MDR ont été les suivantes :

- échec de retraitement ;
- expectoration positif au bout de 4 mois de retraitement ;
- contact avec un cas connu de TB-MDR ;
- expectoration positif au moment du diagnostic dans le cas de retraitement.



Après l'identification potentielle des cas de tuberculose multirésistante, trois échantillons d'expectorations ont été recueillis auprès de chaque patient. Un spécimen a été utilisé pour l'examen microscopique direct par la méthode de Ziehl-Neelsen, le deuxième pour la culture et la réalisation de l'antibiogramme et le troisième a été utilisé pour le test direct (GeneXpert MTB/RIF).

#### **II-2-4- Examen de frottis : Coloration de Ziehl-Neelsen-protocole expérimentale**

La coloration de Ziehl-Neelsen est une coloration assez spécifique pour les mycobactéries. Elle repose sur une caractéristique fondamentale des mycobactéries : leur alcoolo-acido résistance, liée à la présence importante de lipides au niveau de leur paroi.

La coloration de Ziehl-Neelsen utilise 3 réactifs :

- La Fuchsine de Ziehl, colorant rouge associé à un mordant qui colore tout en rouge.
- L'alcool-acide [ou acide dilué] qui décolore tout à l'exception des mycobactéries.
- Le bleu de méthylène qui contrecolore en bleu tout ce qui n'est pas coloré en rouge ;

permettant ainsi d'augmenter le contraste.

On distingue ainsi les Bacilles Alcoolo-Acido Résistant ou BAAR (colorés en rouges) des autres bactéries et du fond (colorés en bleu).

#### **II-2-5- La mise en culture.**

La mise en culture était indispensable en premier lieu pour confirmer la tuberculose active chez les patients et aussi pour avoir un échantillon riche en bacilles sur lequel l'antibiogramme pouvait se faire.

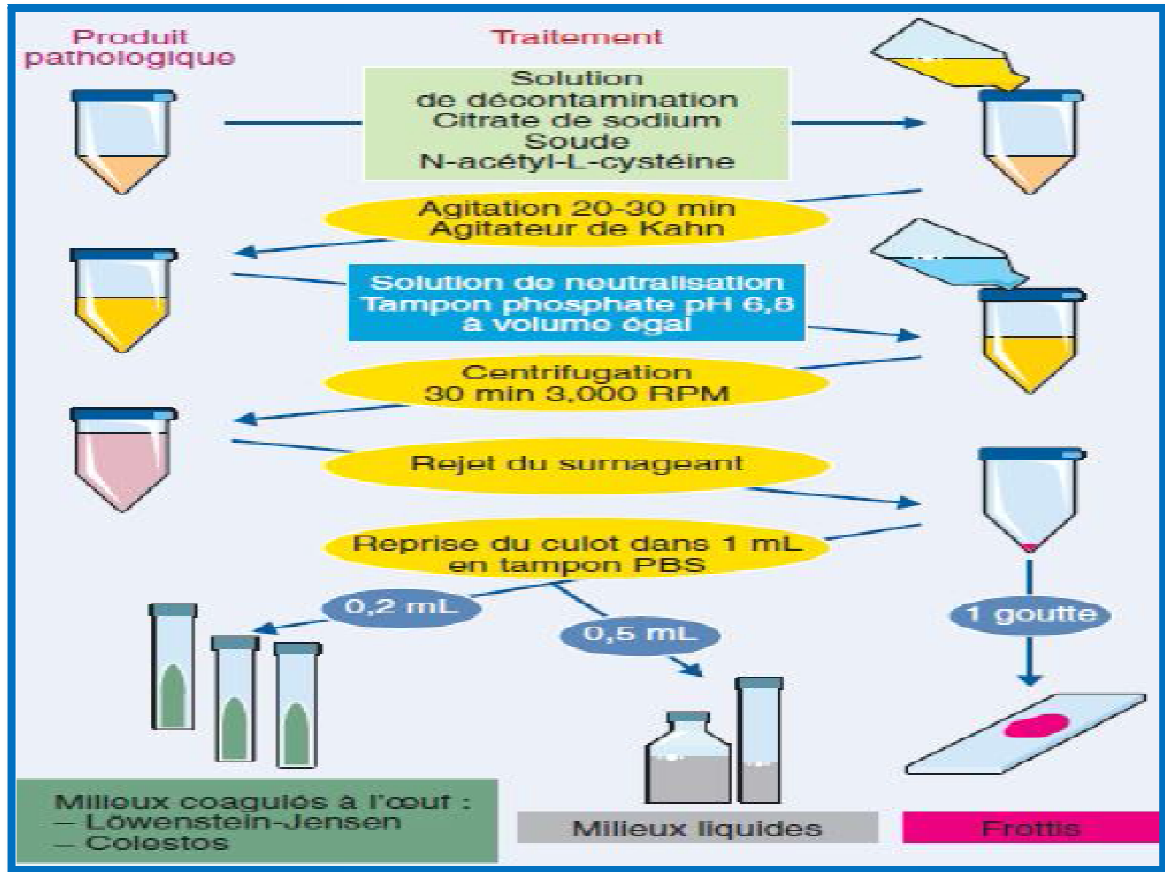
Les cultures étaient pratiquées selon la méthode classique qui consistait en :

✚ Une décontamination : la méthode utilisée est celle de Kubica (N-acétyl-cystéine) : qui consiste à transférer 2 ml maximum de prélèvement dans un pot conique, puis ajouter 2ml de la solution contenant soude/citrate et N-Acétyl-L-Cystéine à 0,5% (NACL), suivie pendant 20 minutes d'une agitation à température ambiante.

✚ Une neutralisation et centrifugation : 18 ml de tampon phosphate sont additionnés, poursuivis d'une centrifugation pendant 20 minutes à 3500 tours /minute.

✚ Ensemencement : le culot de centrifugation estensemencé dans au moins deux tubes contenant un milieu de culture spécifique : le milieu de Loewenstein-Jensen (**Figure 24**). Les tubesensemencés sont incubés à 37°C pendant 4 à 12 semaines. En cas de culture positive,

de grosses colonies en « choux fleur » seront observées à l'œil nu au niveau de la surface du milieu de culture.



**Figure 24 :** Les étapes de traitements des prélèvements pour recherche de BK (Moutaouakkil, 2014).

### II-2-6-Les tests de sensibilité.

Les tests de sensibilité sont utilisés pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'une souche bactérienne aux différents antituberculeux. Les tests de sensibilité aux médicaments étaient réalisés selon la méthode des proportions. Les concentrations critiques de médicaments étaient de 0,2 µg / mL pour l'isoniazide, 40µ g / ml pour la rifampicine, 2µg / ml pour l'éthambutol et 4 µg / ml pour la streptomycine.

Pour chaque couple bactérie-antibiotique, on détermine une concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible. En comparant la CMI aux concentrations critiques, on détermine la sensibilité ou la résistance de la bactérie à l'antibiotique.

- la bactérie est sensible à l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la concentration critique inférieure.
- la bactérie est résistante à l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure.
- la bactérie est intermédiaire à l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques.

### **II-2-7-Test de dépistage rapide de la résistance à la rifampicine : technique GeneXpert MTB/RIF :**

#### ***Procédure pour les échantillons de crachats expectorés :***

Le système Xpert MTB/RIF est une application spécifique pour la tuberculose, mise au point récemment et conçue pour la plate-forme GeneXpert, dans le but de détecter *M. tuberculosis* et les mutations conférant la résistance à la rifampicine directement dans les expectorations avec un test donnant les résultats en deux heures. L'analyse comporte trois étapes manuelles : l'addition du réactif (isopropanol / soude) à l'échantillon pour liquéfier les expectorations et inactiver les bacilles, le transfert de 2 ml d'expectorations liquéfiées dans la cartouche et le chargement de la cartouche dans l'appareil pour le test. Toutes les étapes ultérieures sont automatisées. Le test peut être fait directement sur un échantillon clinique d'expectorations ou sur un pellet concentré et décontaminé.



**Figure 25:** Les étapes du test Xpert MTB/RIF (Francis, 2011).

Le test Xpert MTB/ RIF peut indiquer que *M. tuberculosis*(MTB) n'a pas été détecté, que MTB a été détecté et n'était pas résistant à la rifampicine (c'est-à-dire qu'il est sensible à la rifampicine), ou que MTB a été détecté et était résistant à la rifampicine. Dans de rares cas, le résultat peut montrer une erreur ou ne pas être valide, le test devant alors être répété.

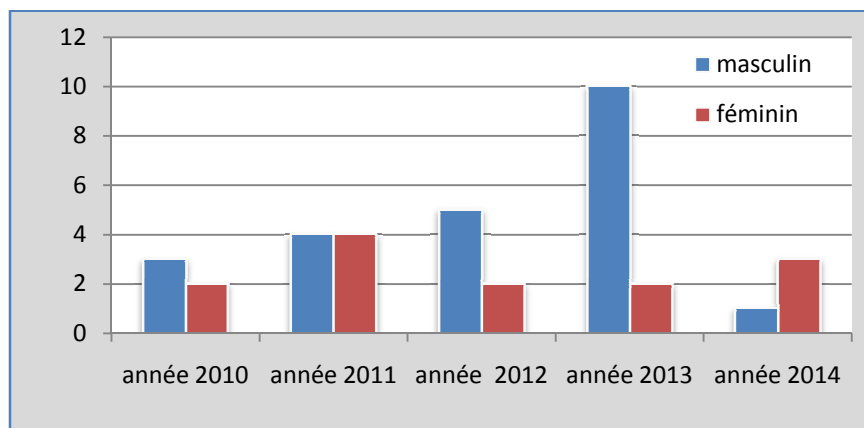
# *Résultats*

**RESULTATS**

**Partie I : étude épidémiologique**

Durant la période d'étude de janvier 2010 au décembre 2014, 36 cas de tuberculose multirésistante ont été enregistrés. Nous avons noté une prédominance masculine avec 23 hommes (63.9%),13 femmes (36.1%) et un sexe ratio de1,76 (**Tableau 4**).

En fonction de l'année de recrutement, la répartition des patients porteurs de tuberculose multirésistante a montré que l'année 2013 a enregistré la plus grande fréquence annuelle avec 33.3% des cas (n=12), suivie par l'année 2011(22.2% ; n=8), l'année 2012 (19.4% ; n=7), l'année 2010 (13.9% ; n=5) et l'année 2014 (11.1% ; n=4). Cette maladie a touché les deux sexes avec différentes proportions (**Figure 26**).



**Figure 26:** Répartition des cas de tuberculose *MDR* selon l'année et le sexe.

L'âge moyen de nos patients a été de 33.7ans (extrêmes : 18- 53 ans). La répartition des cas de tuberculose multirésistante selon l'âge, a montré que les tranches d'âge les plus touchées étaient : 28-37 ans (47,2% ; n=17), (22,2% ; n=8) pour les tranches d'âge 18-27 ans ainsi que 38-47ans et (8,3% ; n=3) pour 48-53 ans (**Tableau 4**).

Deux tiers soit 66,66 % (n= 24) des patients étaient célibataires. Alors que près de 33,34% étaient mariés rendant ainsi difficile l'isolement de ces malades durant la période de contagiosité ; car le risque de contamination du membre de l'entourage familial direct était manifesté (**Tableau 4**).

Le niveau de vie était moyen pour 72,2 % des tuberculeux, par contre a été estimé comme faible pour 19,4 % des cas. 8,3% des patients ont répondu avoir un bon niveau de vie.

Dans notre cohorte analysée, 12 patients étaient des tabagiques chroniques soit à 33.3% (**Tableau 4**).

01 patient sur les 36 était un consommateur d'alcool soit à un pourcentage de 2,8 (**Tableau 4**).

01 patiente présentait un diabète, ce qui représentait 2,8% de l'ensemble des cas enregistrés (**Tableau 4**).

Le dépistage de l'infection HIV était recommandé. Ainsi tous les patients ont pu bénéficier d'une sérologie HIV. Un seul patient était co-infecté, il s'agissait d'un homme âgé de 50 ans (**Tableau 4**). La majorité des patients présentaient une localisation thoracique isolée de tuberculose, cependant 02 malades avaient une double localisation thoracique et extra-thoracique (**Tableau 4**). Les tuberculoses extra-thoraciques notées étaient : mal de pot et méningo-encéphalite. Aucune localisation extra-thoracique isolée n'était observée.

100% des patients multirésistants enregistrés n'avaient pas de tuberculeux dans leur entourage familial. De même, pour les antécédents familiaux de multirésistance, 92% des cas n'avaient aucun malade TB-MDR dans leurs familles, mais dans le reste des cas (8% des malades) il existait au moins un tuberculeux multirésistant ; 02 patients avaient 01 multirésistant dans la famille, alors que pour un autre patient nous avons noté la présence de 04 multirésistants dans la même famille (**Tableau 4**).

01 malade a signalé un décès par tuberculose multirésistante dans son entourage familial et 4 décès pour un autre cas.

**Tableau 4 :** Caractéristiques sociodémographiques et cliniques des cas de TB-MDR.

Variable	Effectifs		Fréquence (%)	
<b>Tranches d'âge</b>				
18-27	8		22,2	
28-37	17		47,2	
38-47	8		22,2	
48-53	3		8,3	
<b>Sexe</b>				
Féminin	13		36,1	
Masculin	23		63,9	
<b>Etat civil</b>	<b>Féminin</b>	<b>Masculin</b>	<b>Féminin</b>	<b>Masculin</b>
Célibataire	9	15	69	65
Marié	4	8	31	35
<b>Niveau socio-économique</b>				
Bon	3		8,3	
Moyen	26		72,2	
Faible	7		19,5	
<b>Habitudes toxiques</b>	<b>Tabagisme</b>	<b>Alcoolisme</b>	<b>Tabagisme</b>	<b>Alcoolisme</b>
OUI	12	1	33,3	2,8
NON	24	35	66,7	97,2
<b>Comorbidités</b>	<b>HIV</b>	<b>Diabète</b>	<b>HIV</b>	<b>Diabète</b>
OUI	1	1	2,8	2,8
NON	35	35	97,2	97,2
<b>Localisation de la tuberculose</b>				
TBP	34		94,4	
TBP+TBEP	2		5,6	
<b>Antécédents familiaux de TB-MDR</b>				
0	33		92	
1	2		5	
4	1		3	

La résistance peut être primaire ou acquise. Dans notre cohorte analysée, la résistance primaire a été enregistrée chez 04 cas soit 11,11% de l'effectif, ces malades n'ont jamais été traités auparavant pour une tuberculose pulmonaire. Par contre une résistance acquise a été détecté chez 32 patients soit à 88,89%. Ces malades ont déjà été traités pour la tuberculose.

La multirésistance était confirmée chez tous les malades. Il s'agissait d'une résistance à l'H (Isoniazide) et R (Rifampicine) dans 13,8 % des cas (n=5) ; à l'H, R et streptomycine (S) dans 50 % des cas (n=18) ; à l'H, R et éthambutol (E) dans 5,6 % des cas (n=2). Le pourcentage des patients qui avaient perdu la sensibilité du bacille aux quatre antituberculeux de première ligne (H, R, S et E) était de 25 sur l'ensemble des malades testés (n=9) et a l'H, R, S, et



ofloxacin (O) dans 2,8 % des cas (n=1). Un patient présentait une TB ultrarésistante (XDR) soit à 2,8 %. Aucune monorésistance ou polyrésistance a été enregistrée (**Tableau 5**).

**Tableau 5 : Résultats des antibiogrammes**

Résistance aux anti-tuberculeux	Effectif	Pourcentage
H+R	5	13,8
H+R+E	2	5,6
H+R+S	18	50,0
H+R+S+E	9	25
H+R+S+O	1	2,8
tous les ATB: cas XDR	1	2,8
Total	36	100,0

Concernant les problèmes relatifs au traitement de troisième intention, près de la moitié des patients (47,2% ; n=17) ont présenté des effets secondaires. Un cas présentait un défaut d'observance sans relation avec un autre problème (5.6%), le même pourcentage était enregistré chez un autre patient présentant un défaut d'observance en relation avec les effets secondaires. Aucune information n'était mentionnée pour le patient présentant une tuberculose ultrarésistante (XDR). Ainsi pour 14 malades (38,8 %) aucun problème n'a pu être souligné (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Distribution des cas selon les problèmes du retraitement**

Problèmes du retraitement	Effectif	Pourcentage
Défaut d'observance	2	5.6
Défaut d'observance + Effets II	2	5.6
Effets II	17	47.2
RAS	14	38.8
NM	1	2.8
Total	36	100

En analysant les issues de traitement de l'épisode de tuberculose multirésistante, la guérison a été notée pour 10 cas soit à 27,78 % et 5 malades ont été décédés soit à 13.88 %.

11.11% des malades (n=4) ont été perdues de vue et 17 patients soit 47,33% étaient encore en cours de traitement (**Tableau 7**)

**Tableau 7 : Issue du traitement de la tuberculose multirésistante**

<b>Issue de traitement</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage</b>
Décès	5	13.88
Traitement en cours	17	47.23
Guérison	10	27.78
Perdue de vue	4	11.11
Total	36	100

**2-Partie II : étude moléculaire:**

L'utilisation de technique GeneXpert MTB/RIF dans la présente étude a pour but :

- le diagnostic moléculaire rapide des cas positifs de tuberculose pulmonaire ;
- la détection moléculaire rapide de la résistance à la rifampicine.

Un total de 50 patients constitués de 35 hommes ; et 15 femmes a été enregistré au cours de la période d'étude. L'âge moyen était de 33,50 (extrêmes 18-54ans). Le sex ratio hommes: femmes était de 2,33 (**Tableau 8**).

**Tableau8:** Caractéristiques Sociodémographiques des patients.

Variables		Fréquence	%
<b>Age</b>			
≤ 20		4	8,0
21-30		18	36,0
31-40		14	28,0
41-50		10	20,0
51-60		4	8,0
<b>Sexe</b>			
F		15	30,0
M		35	70,0
<b>Etat civil</b>			
Célibataire		32	64,0
Marié		17	34,0
Divorcé		1	2,0
<b>Niveau socio-économique</b>			
Bon		7	14,0
Moyen		29	58,0
Faible		14	28,0
<b>Habitudes toxiques</b>			
Tabagisme	P	23	46,0
	N	27	54,0
Alcoolisme	P	7	14,0
	N	43	86,0
<b>Comorbidités</b>			
HIV	P	0	0.0
	N	50	100.0
Diabete	P	3	6,0
	N	47	94,0

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a été détectée par le test Xpert MTB / RIF dans tous les échantillons pulmonaires. La comparaison des résultats de l'examen microscopique par la coloration de ZN des frottis avec le test GeneXpert a révélé la présence du MTB dans tous les frottis des échantillons positifs de crachats (n = 50). De la même façon GeneXpert® a détecté MTB dans tous les échantillons (n = 50) qui étaient positifs pour la culture sur milieu L.J (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Comparaison du test Gene Xpert avec Zn frottis et les résultats de la culture LJ.

Gene Xpert MTB/RIF	Diagnostic par Ziehl-Nelsen		Diagnostic par Culture Lowenstein-Jensen	
	Positive	Negative	Positive	Negative
<b>GeneXpert:Résultat positive</b>	50	00	50	00
<b>GeneXpert:Résultat Negative</b>	00	00	00	00
<b>Total</b>	50	00	50	00

La sensibilité et la spécificité du test GeneXpert pour les échantillons culture positive, microscopie positive a été de 100 % et 100% respectivement (**Tableau 10**).

**Tableau 10 :** Comparaison des résultats de GeneXpert par rapport à la culture LJ.

Xpert MTB/RIF		Culture LJ	
		Positive	Negative
<b>Xpert MTB/RIF</b>	<b>MTB Détecté</b>	50	0
	<b>MTB Non Détecté</b>	0	0

Sensibilité 100%      Spécificité 100%

Sur un total de 50 cas inclus dans cette étude, MTB a été détectée chez tous les patients (100%) par GeneXpert MTB / RIF. Cependant, la résistance à la rifampicine a été détectée dans seulement 21 cas (42%).La répartition par sexe a montré que 15cas (71,43%) étaient des hommes et 6cas (28,57%) étaient des femmes parmi ceux résistants à la rifampicine (**Tableau 11**).

**Tableau 11 :** Répartition des cas selon la résistance à la rifampicine.

Sexe	RIFAMPICINE		Total	p- value
	Resistance	Sensibilité		
<b>Masculin</b>	15 (42.9%)	20 (57.1%)	35 (100.0%)	0.8
<b>Féminin</b>	6 (40.0%)	9 (60.0%)	15 (100.0%)	
<b>Total</b>	21 (42.0%)	29 (58.0%)	50 (100.0%)	

La distribution selon l'âge a montré que la majorité des patients résistants à la Rifampicine appartenait au groupe de 31-40 ans d'âge (n = 10 ; 47,62 %). En comparaison avec les tests phénotypique de sensibilité aux médicaments, le test RIF Xpert MTB /RIF a correctement identifié le total de vingt-un cas (100%) résistants à la rifampicine avec une sensibilité et une spécificité de 100 % et 100 % respectivement.

42,85 % des cas étaient des cas d'échec de retraitement, les cas de retraitement frottis positif à 4 mois étaient de 23,82 %. Alors que 19,05% étaient des cas de retraitement frottis positif au moment du diagnostic, et 14,28% des patients avaient des antécédents de contact avec la TB-MR (Tableau 12).

**Tableau 12:** Répartition des cas de résistance a la Rifampicine selon la catégorie des patients.

Catégorie	Fréquence	%
<b>Echec de retraitement</b>	9	42.85%
<b>Cas de retraitement frottis positif à 4 mois</b>	5	23.82%,
<b>cas de retraitement frottis positif au moment du diagnostic</b>	4	19.05%
<b>Contact connu avec cas MDR-TB</b>	3	14.28%
<b>Total</b>	21	100%

21 cas ont été identifiés comme étant MTB résistantes à la rifampicine par la méthode conventionnelle et confirmé par la technique moléculaire (le test Gene Xpert MTB / RIF).

La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative de Xpert MTB / RIF pour détecter la résistance à la RIF en comparaison avec la technique phénotypique classique de test sensibilité aux antituberculeux ont été trouvés égaux aux taux de 100, 100, 100 et 100 %, respectivement.

La comparaison des résultats des techniques phénotypique et génotypique du test de sensibilité aux médicaments a montré que toutes les souches portant des mutations dans le gène *rpoB* étaient phénotypiquement résistantes à la rifampicine et l'isoniazide. Nos résultats montrent que toutes les souches résistantes à la rifampicine détectées par GeneXpert MTB / RIF ont été, phénotypiquement, confirmées comme souches multirésistantes (Tableau 13).

**Tableau 13:** Prévalence de tuberculose multirésistante (MDR-TB).

		DST			MDR-TB	p- value
		RIF Resistance	RIF Sensible	Isoniazide Resistance		
<b>Xpert MTB/RIF</b>	<b>Resistance à RIF détectée</b>	21	0	21	21	0,001
	<b>Resistance à RIF non détectée</b>	0	29	0	0	

# *Discussion*

### *DISCUSSION*

La lutte contre la tuberculose repose sur l'interruption de la chaîne de transmission par une détection rapide des cas et leur traitement adéquat (**WHO, 2010 b**). La résistance des mycobactéries aux antituberculeux est un phénomène qui se répand dans le monde entier. Elle est aussi un facteur déterminant pour l'éradication de la tuberculose (**WHO, 2010 c**).

Durant la période d'étude de janvier 2010 au décembre 2014, 36 cas ont été enregistrés. Le sexe masculin était prédominant dans 63,9 % des cas avec un sex-ratio de 1,76. Nos résultats se rapprochent de ceux d'Ouardi qui dans son étude menée dans le même service avait noté une prédominance masculine et un sex-ratio de 1,4 (**Ouardi, 2013**). En matière d'épidémiologie de la TB, la prédominance masculine a été également rapportée par d'autres travaux. En effet, Houndonougbo et Sidibé avaient trouvé une nette prédominance masculine chez 83% et 83,9% des cas, avec un sex-ratio de 4,87 et 5,2 respectivement (**Houndonougbo, 2011 ; Sidibé, 2009**). De même Sangaré a constaté dans un effectif composé majoritairement d'adultes jeunes avec une prédominance masculine (68%) (**Sangaré et al., 2010**). Cette dernière pourrait résulter de différences d'exposition entre les hommes et les femmes dans leur rôle sociétal, c'est-à-dire en rapport avec leurs activités (**Holmes et al., 1998**). En effet, les hommes occupent différents secteurs d'activité, ce qui facilite la transmission du bacille tuberculeux (**Kouassi et al., 2004**). Par contre Caminero et Shean ont trouvé une prédominance féminine avec respectivement des sex -ratio de 2,5 et de 3,5 à enlever en faveur des femmes (**Caminero, 2006 ; Shean et Willox, 2006**).

Selon Dominique Labie dans son étude portée sur la résistance du *Mycobacterium tuberculosis*, la tuberculose touchait en priorité 75% des patients dont l'âge était compris entre 15-45 ans (**Dominique, 2007**). Dans notre série la tranche d'âge de 28-37 ans était la plus touchée avec 47,2% des cas. Ces résultats concordent avec ceux d'Ouardi (**Ouardi, 2013**) et de Houndonougbo (**Houndonougbo, 2011**) qui ont constaté que les tranches d'âge de 25-34 ans et 21-40 ans étaient les plus représentées avec 45,3% et 53,20% des cas respectivement. Un niveau de vie moyen a été souligné pour 72,2% des patients. Ce résultat concorde avec celui d'Ouardi (**Ouardi, 2013**) qui a constaté dans son enquête que 59,8 % des patients s'estimaient d'être d'un niveau de vie moyen.

66,7% des patients étaient célibataires contre 33,3% mariés. De même Ouardi (**Ouardi, 2013**) a noté 54,6% de patients célibataires, alors que Moutaouakkil (**Moutaouakkil, 2014**) a noté seulement 25% de patients célibataires contre 75% des patients mariés.

Les facteurs de risque de TB-MDR soulignés dans notre série étaient : le tabac ( $n=12$  ; 33,3%), l'alcoolisme ( $n = 1$  ; 2,8%), les antécédents familiaux de TB-MR ( $n = 3$  ; 8,33%), le diabète ( $n =1$ ) et le HIV=1 équivaut à 2,8% pour chacun.

La présence d'un diabète peut potentialiser les effets indésirables des antituberculeux, notamment les dysfonctionnements rénaux. Le faible taux de la co-infection par le VIH chez les malades tuberculeux montre que l'épidémie mondiale de VIH n'a pas, en Algérie, d'impact pratique sur l'incidence de la tuberculose ni sur les résultats du traitement. Elle prouve que le VIH circule peu et dans des populations actuellement limitées (**Manuel de la lutte antituberculeuse, 2011**).

En Tunisie, Snène a constaté dans son étude portée sur cinquante-quatre patients que les facteurs de risques étaient : le tabac ( $n = 42$ ), l'incarcération ( $n = 4$ ), la toxicomanie ( $n = 6$ ), les antécédents familiaux de TB-MR ( $n = 4$ ) et les comorbidités ( $n = 4$ ) (**Snène et al., 2014**). Au Maroc, dans l'étude de Moutaouakkil le tabagisme a représenté un pourcentage de 36,11%, le diabète 20,58% et l'asthme 02,79%. Aucun tuberculeux n'était séropositif pour le HIV dans cette série (**Moutaouakkil, 2014**).

Un taux de 11,11% de résistance primaire a été souligné dans notre étude. Ce résultat est largement inférieur à celui de Kabedi (**Kabedi et al., 2007**) qui avait noté un taux de résistance primaire de 43,5% et celui de Kashongwe (31,6 %) (**Kashongwe et al., 1995**) ; Ainsi que ceux des autres pays africains, comme le Maroc (23,9 %), le Cameroun (31,8 %), le Bénin (18,5 %) et le Kenya (14,4 %). En revanche, ce taux est proche de celui noté à Malawi (11,8 %) mais supérieur à celui enregistré en Afrique du Sud (6,9 %) (**Bagdadi et al., 1997 ; Hawken et al., 2001 ; Kuaban et al., 2000 ; Sabai et al., 2003 ; Schaaf et al., 2000 ; Trébucq et al., 1999**).

Dans notre cohorte de 36 tuberculeux, la multirésistance a été confirmée chez tous les patients.

Il s'agissait d'une résistance à l'H et R chez 13,8 % des cas ( $n=5$ ) ; à l'H, R et streptomycine (S) chez 50 % des cas ( $n=18$ ) ; à l'H, R et éthambutol (E) chez 5,6 % des cas ( $n=2$ ). La résistance aux quatre antituberculeux de première ligne (H, R, S et E) était enregistrée chez 25 % de l'ensemble des malades testés ( $n=9$ ) et l'H, R, S, et ofloxacine (O) chez 2,8 % des cas ( $n=1$ ). Un patient présentait une TB ultrarésistante (XDR) soit à 2,8%. Nos résultats sont en accord avec ceux notés par Dr. Ouardi qui a constaté dans son étude que la résistance de type d'association R+H+S était la plus fréquente avec 32% des cas suivie par R+H+E+S avec 16,8%. Dans la cohorte de Snène, il s'agissait d'une résistance à l'H et R dans 33 % des cas ; à l'H, R et streptomycine (S) dans 15 % des cas ; à l'H, R et éthambutol (E) dans 10 %



des cas ; l'H, R, S et E dans 20 % des cas et l'H, R, S, E et pyrazinamide (Z) dans 20 % des cas.

Parmi les 36 malades, dix-sept(17) soit 47,23% des malades poursuivaient leur traitement, alors que Sidibé et Houndonougbo avaient signalé, dans leurs séries, un taux de 54,8%et 66% respectivement (**Sidibé, 2009 ;Houndonougbo, 2011**).

Un taux d'abondance de traitement par les malades a été noté pour 11.11% des cas, tandis que Sidibé avait enregistré un taux de 25,8%(**Sidibé, 2009**). Houndonougbo (**Houndonougbo, 2011**) et Ouardi (**Ouardi, 2013**) ont noté un taux plus bas soit respectivement à 6,4% et 6,25%.

Nous avons enregistré un taux de décès de 13,88% chez la population étudiée. Ce résultat est inférieur à celui rapporté dans les séries de Houndonougbo (14,9%) (**Houndonougbo, 2011**), Sidibé (16,1%) (**Sidibé, 2009**), Horo(15,2%)(**Horo et al., 2011**) et Ouardi (15%) (**Ouardi, 2013**).

Un taux de guérison de 27,78%a été souligné dans notre série. Ce résultat est loin de celui rapporté dans la série d'Ouardi (**Ouardi, 2013**) soit un taux de guérison de 61,25%. Houndonougbo n'avait pas enregistré des cas de guérison (**Houndonougbo, 2011**).En Côte d'Ivoire, Horo et *al.*ont rapporté un taux de guérison de 5,1 % (**Horo et al., 2011**). Yew et *al.*ont rapporté un taux de guérison de 81,00 % en Chine (**Yew et al., 2000**).Les succès thérapeutiques varient de 50 % à Taiwan (**Kir et al., 2006**)à plus de 80 % à Hong Kong (**Yew et al., 2000**), en Corée (**Park et al., 1998**) et en Turquie (**Tahao glu et al., 2001**).Les forts succès thérapeutiques dans ces pays sont le fait des diagnostics précoces de la TB-MDR.

Les effets secondaires des traitements étaient polymorphes et représentaient le problème majeur de déroulement de traitement de troisième intention. Les mêmes résultats ont été rapportés par Sidibé (**Sidibé, 2009**) ainsi que par Horo (**Horo et al., 2011**).

*Mycobacterium tuberculosis* est un problème majeur de santé publique dans le monde. Les techniques de laboratoire classiques comme la microscopie directe (coloration ZN) pour le diagnostic de la tuberculose à partir d'échantillons cliniques est moins sensible par rapport à la culture sur milieu (**Lawn et Nicol, 2011**). De plus, les cultures conventionnelles nécessitent beaucoup du temps (**Hillemann et al., 2011**). Récemment, l'attention a été consacrée aux derniers systèmes de diagnostic d'amplification des acides nucléiques en raison de leur vitesse et de leur précision. Le test GeneXpert MTB / RIF est un test rapide à base de biologie moléculaire qui peut être utilisé à proximité du point de service par les opérateurs ayant une expertise technique minimale. La technique permet le diagnostic de la tuberculose et de

l'évaluation simultanée de la résistance à la Rifampicine au bout de 2 heures (**Helb et al., 2010**). L'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé l'utilisation du test Gene Xpert MTB / RIF pour la détection rapide de la tuberculose dans les échantillons pulmonaires (**Helb et al., 2010**).

Le but de notre présente étude, était d'évaluer la précision du test Gene Xpert MTB / RIF dans le diagnostic de tuberculose pulmonaire et de comparer cette technique avec les techniques classiques (coloration de ZN, les méthodes classiques de culture).

Une prédominance masculine a été notée avec 25 hommes (58%) et 15 femmes (42%) ; ce résultat est en accord avec des études antérieures (**Olusoji et al., 2013 ; Otu et al., 2013**), et concorde avec les travaux de **Taura et al.** et **Rasaki et al.** (**Taura et al., 2008 ; Rasaki et al., 2014**), où le sexe masculin a été respectivement souligné à 61,5% et 60% dans l'ensemble des cas. Cette prédominance pourrait être due au fait que les sujets de sexe masculin sont plus exposés à des facteurs d'infection de la tuberculose, comme le tabagisme.

La spécificité du test Xpert dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire a été montrée pour être très élevé (97-100%) dans les études de démonstration coordonnée par la Fondation pour l'Innovation de Nouveaux Diagnostics (FIND) dans des échantillons pulmonaires (**Nicol et al., 2011**). La sensibilité de GeneXpert MTB / RIF pour les cas de tuberculose à frottis positif, culture positive a été de 100%. Cela a été en accord avec d'autres études antérieures (**Darwish et al., 2013 ; Iram et al., 2015**).

Des études menées dans différentes parties du monde ont rapporté une sensibilité et une spécificité élevées du test Gene Xpert MTB / RIF utilisé dans notre étude. Dans une étude réalisée par **Raizada**, portée sur une population de 8,8 millions dans 18 unités de tuberculose (TU) en Inde, l'ensemble de 28% des cas de la tuberculose ont été bactériologiquement confirmés, dont 27,6% des cas de tuberculose ont été détectés par Xpert MTB / RIF contre taux de positivité de microscopie des frottis de 12,9% (**Raizada et al., 2015**). Dans une étude similaire, **Raizada**, a rapporté parmi les 485 cas de tuberculose pulmonaire bactériologiquement confirmés enregistrés chez des enfants (0-14 ans), le test Xpert MTB / RIF a détecté la tuberculose à 98,4%, alors que 54,9% de ces cas étaient de microscopie négative (**Raizada et al., 2014**).

Une étude clinique de validation de la méthode a été réalisée en utilisant 107 échantillons de crachats cliniques de cas suspects de tuberculose au Vietnam. Le test Gene Xpert MTB/RIF a détecté 29/29 (100% de sensibilité) des cas à culture positive et frottis positif et 33/39 (84,6 % de sensibilité) des cas à culture positive et frottis négatif, et *M. tuberculosis* n'a pas été décelé

dans 25/25 (100% de spécificité) des échantillons de culture négative. Dans la même étude, 64 expectorations des patients précédemment traités pour la tuberculose en Ouganda, avec culture positive et frottis positif ont été testés par le test GeneXpert MTB/ RIF ; ce dernier a détecté 63/64 des cas (98,4% de sensibilité) (**Helb et al., 2010**).

Il est très important de noter que le temps de détection de *M.tuberculosis* par le test Gene Xpert MTB / RIF est de 2 heures, cependant ce de la culture sur milieu LJ est de 3-8 semaines. Dans notre étude, le temps moyen d'exécution pour la positivité de la culture était de 5 semaines et de 1-24 heures environ pour la coloration de Zn (microscopie directe). Nous pouvons recommander le test GeneXpert MTB / RIF comme un nouvel outil pour le diagnostic rapide de la tuberculose. Iqbal a déterminé dans son étude que le temps moyen de détection de *Mycobacterium tuberculosis* était de 24 jours par la culture LJ et moins de 1 jour par l'examen des frottis (**Iqbal et al., 2011**). Siddiqui a observé que le délai moyen pour la positivité de la culture était de 23.13 jours avec un milieu LJ (**Siddiqui et al., 2013**). Le test Gene Xpert est non seulement indispensable pour le diagnostic rapide de *M.tuberculosis*, mais aussi utile pour la détection rapide de la résistance à la rifampicine chez les cas suspects de TB-MDR.

La TB-MDR est une conséquence de la chimiothérapie inappropriée, l'approvisionnement en médicaments irrégulière, la mauvaise utilisation des médicaments antituberculeux, une mauvaise gestion de la tuberculose, et le manque de contrôle. Pour ces raisons, les efforts sont orientés vers la recherche de moyens pour accélérer le processus de tests de sensibilité (**Zakham et al., 2013**).

Dans cette étude, nos objectifs étaient d'utiliser un test d'amplification des acides nucléiques type Gene Xpert® MTB / RIF pour évaluer la résistance à la rifampicine dans les cas positives de tuberculose pulmonaire et de comparer entre les techniques phénotypiques et génotypiques de test de sensibilité aux antituberculeux et surtout la recherche de la résistance à la rifampicine chez des cas clinique suspects de TB-MDR. La tuberculose multirésistante (MDR- TB) est définie comme la tuberculose causée par des souches de *M. tuberculosis* qui sont résistantes au moins à l'isoniazide et la rifampicine (RIF) (**WHO, 2010**). La monorésistance à la RIF est rare ; cependant, 90% des isolats résistants RIF présentent également une résistance à l'isoniazide. Par conséquent, la détection de la résistance à la RIF peut servir comme marqueur de substitution pour *M.tuberculosis* MDR (**Ioannidis et al., 2011**). Pour la détection de résistance à la rifampicine, Xpert® MTB / RIF fournit des

résultats précis et peut permettre l'initiation rapide du traitement MDR -TB (Steingart *et al.*, 2014).

Dans notre étude, 21 patients (42 %) étaient résistants à la rifampicine, tandis que 29 (58%) étaient sensibles. Ceci est similaire à ceux rapportée par Trivedi (Trivedi et Desai, 1988) et Shah (Shah *et al.*, 2002) où (37,3%) et (37,47 %) étaient résistants à la rifampicine respectivement, mais inférieure à ceux de l'étude de Chowgule qui a rapporté une incidence très élevée de résistance à la rifampicine de (66,8 %) (Chowgule et Deodhar, 1998) .Ce niveau de résistance a été supérieure à celui noté dans l'étude de Rasaki *et al.* (Rasaki *et al.*, 2014), Olusoji *et al.* (Olusoji *et al.*, 2013), Lawson *et al.* (Lawson *et al.*, 2010), Ganguly *et al.* (Ganguly *et al.*, 2015) où ( 7,2% ) ,( 8,6% ) ,( 19% ) , ( 29,87% ) des isolats étaient résistants à la rifampicine, respectivement, et Idigbe *et al.* (Idigbe *et al.*, 1998) qui a rapporté que 2% des cas étaient résistants à la rifampicine à Lagos, au Nigeria. Cependant, aucune souche résistante n'a été signalée dans l'étude d'Akaninyene *et al.* (Akaninyene *et al.*, 2002). Une prépondérance masculine a été enregistrée avec 15 cas (71,43%) contre 6 cas (28,57%) de femmes ; ce résultat est en accord avec les travaux de Ganguly *et al.* (Ganguly *et al.*, 2015) où les sujets de sexe masculin avaient une prévalence de 85,71% contre 14,29% de femmes.

Dans la présente étude, la répartition selon l'âge a montré que la majorité des patients présentant une résistance à la rifampicine appartenait à la tranche d'âge 31-40 ans (n = 10; 47,62%), suivie par 21-30 ans et 41-50 ans avec (n = 4; 19,04%) pour chaque groupe d'âge. Ce fut dans la concorde avec l'étude d'Aleyamma Thomas *et al.* (Aleyamma Thomas *et al.*, 2007). En TRC, Chennai, a remarqué que 70% des patients résistants aux médicaments étaient des hommes et leur âge moyen était de 37 ans. Dans une autre étude réalisée par Robert *et al.* (L'âge et la répartition par sexe était similaire à l'étude de Ganguly *et al.* (Ganguly *et al.*, 2015) où le nombre maximum de patients présentant une résistance rifampicine étaient de sexe masculin et étaient dans le groupe des 21-30 ans (26,53%), suivie par le groupe d'âge de 31-40 ans (22,44%).

Dans notre cohorte analysée, 42,85% des patients étaient des cas d'échec de retraitement, un taux de 41,83% a été enregistré dans l'étude de Ganguly *et al.* (Ganguly *et al.*, 2015). Dans une étude réalisée par Gupta *et al.* (Gupta *et al.*, 2014) il a été constaté que 34% des cas d'échec de retraitement étaient résistants aux médicaments, ce qui est similaire à notre étude. Une prévalence élevée de la TB-MR dans l'échec de retraitement ne se limite pas à l'Inde et a été documentée au Vietnam (Quy *et al.*, 2003), la Thaïlande ( Yoshiyama *et al.*, 2004) et le

Rowanda (**Rigout et al., 1994**). Les cas de retraitement frottis positif à 4 mois ont été à 23,82%, ce niveau était supérieur à celui de l'étude de Ganguly *et al.* (**Ganguly et al., 2015**) où des cas de retraitement frottis positif à 4 mois jugés à 8,16% parmi les cas résistants rifampicine. 19,05% des cas étaient des cas de retraitement frottis positif au moment du diagnostic. Dans les études de Sharma *et al.* (**Sharma et al., 2011**) et Ganguly *et al.* (**Ganguly et al., 2015**), la résistance aux médicaments a été respectivement trouvée dans 20% et 22,44% des cas de retraitement au moment du diagnostic, ce qui est similaire à notre étude. Ganguly *et al.* (**Ganguly et al., 2015**) ont trouvé un seul cas résistant (1,02%) avec l'histoire de contact avec la TB-MDR. Cela est compatible avec une étude réalisée par Singla *et al.* (**Singla et al., 2011**) dans laquelle seulement 0,66% des contacts développaient une MDR-TB. C'était inférieur à ce que nous avons trouvé dans notre étude où 14,28% des patients présentaient une histoire de contact avec la TB-MDR.

En Afrique, 1,9% des nouveaux cas et 9,4% des patients diagnostiqués et traités sont infectés par la souche MDR (**WHO, 2008**). Les résultats de cette étude ont montré que toutes les souches portant des mutations dans *rpoB* étaient phénotypiquement des souches MDR. Cela est comparable à 77,4% rapporté par Olusoji *et al.* (**Olusoji et al., 2013**). Peu d'études ont documenté la présence de cas infectés par des souches MDR au Nigeria, avec un taux de prévalence allant de 4% - 76,3% (**Dosumu et al., 2008 ; Daniel et Osman, 2011**) mais il était bien supérieur aux résultats trouvés par Rasaki *et al.* (**Rasaki et al., 2014**), où quarante-quatre cas (31,4%) étaient positifs, et aux taux publiés dans les études antérieures en Inde (**Trevedi et Desai, 1988 ; Jain et al., 1992**).

Par rapport à la technique phénotypique DST, le test MTB /RIF a correctement identifié 21 des 21 patients (sensibilité à 100%) avec des bactéries RIF-résistantes et 29 de 29 (100% spécifique) avec des bactéries RIF-sensibles, ce qui est similaire aux résultats soulignés dans une étude menée en Ouganda, où 64 expectorations à frottis positif et culture positive chez les patients précédemment traités pour la tuberculose ont été testés par le test Xpert MTB /RIF où neuf des cas ont été détectés (sensibilité de 100%) avec une résistance à la RIF. La résistance RIF a été exclue dans 55/55 cas sensibles à la rifampicine (spécificité de 100%) (**Helb et al., 2010**). Dans une étude multicentrique récente (Pérou, l'Azerbaïdjan, l'Afrique du Sud et de l'Inde) d'évaluation de 1730 patients suspects de tuberculose pulmonaire sensible aux médicaments ou multirésistante, le test MTB /RIF a identifié 200 de 205 patients (97,6% sensibles) avec des bactéries RIF-résistantes et 504 de 514 (98,1% spécifique) avec des bactéries RIF sensibles (**Boehme et al., 2010**). Dans l'étude de Darwish *et al.* (**Darwish et al., 2013**) le

Gene Xpert MTB / RIF a révélé cinq des six cas comme étant *M. tuberculosis* RIF résistantes par la méthode classique pour être MTB RIF résistantes avec une sensibilité de 83% et une spécificité de 100%. Steingart *et al.* (Steingart *et al.*, 2013) ont souligné que Gene Xpert MTB / RIF peut être utilisé comme un test de diagnostic initial pour la détection de la tuberculose et résistance à la rifampicine chez les patients suspects de tuberculose, TB-MDR ou TB associée au VIH.

# *Conclusion*

### **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Malgré la découverte, au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, des principaux antibiotiques contre *M. tuberculosis* et l'existence d'un vaccin : le BCG ;La tuberculose reste encore terriblement d'actualité avec près de deux millions de morts chaque année dans le monde. La compréhension de l'épidémiologie de la tuberculose et les actions de contrôle de la maladie, ont été récemment compliquées par l'émergence de bacilles tuberculeux résistants aux antibiotiques et par la synergie fournie par la coïnfection avec le VIH.

L'approche moléculaire des infections à mycobactéries permet de diminuer considérablement le délai de diagnostic. En effet, ces nouvelles méthodes d'identification et de détection de la résistance fournissent des résultats fiables, pour une prise en charge plus précoce des patients.

Dans notre étude portée sur l'analyse de la tuberculose multirésistante dans l'ouest Algérien on a constaté que malgré l'amélioration dans la réalisation de la culture et du test de sensibilité, des efforts restent à consentir pour la prise en charge de patients porteurs des souches *MDR*. Le taux de résistance primaire et même secondaire trouvé dans cette étude constitue une menace pour les efforts de contrôle de la tuberculose *MDR* en Algérie. Il est donc important d'actualiser les résultats et d'évaluer l'ampleur du problème. Les données disponibles actuellement ne permettent pas d'analyser plus précisément les causes de cette augmentation.

Pour lutter contre les *MDR*, nous devons avoir comme objectif principal d'éviter la création de nouveaux cas *MDR*. La détection des cas reposant sur l'examen microscopique des frottis de crachats et sur un algorithme clinique doit rester à tous les niveaux la pierre angulaire du diagnostic de la tuberculose.

Dans notre cohorte analysée, la comparaison entre les résultats phénotypiques de tests de sensibilité aux antituberculeux basée sur la technique standard (l'antibiogramme par méthode de proportions) et celles de technique moléculaire en utilisant le test MTB/RIF a montré que toutes les souches révélées RIF-résistantes étaient des souches MTB-*MDR* chez les cas suspects de tuberculose multirésistante.

Dans la plupart des contextes, le test MTB/RIF doit être considéré à ce stade comme un test qui fait suite à l'examen microscopique, et son utilisation devrait être encouragée particulièrement dans les lieux à haute prévalence du VIH, en vue d'un meilleur diagnostic de la tuberculose pour les patients dont les frottis des crachats sont négatifs.



Deux Exhortations principales sont proposées. La première est d'évaluer les facteurs de risques de la multirésistance en collectant des données bien précises sur l'historique personnel et thérapeutiques des tuberculeux résistants ou encore qui ont une association TB/VIH et qui sont fort suspects de TB-MDR. La seconde est d'appliquer des techniques moléculaires pour identifier les bacilles résistants circulants dans la région, pour cela le géotypage de toutes les souches résistantes sur plusieurs années sera nécessaire.

*Article*

# Use of GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/rifampicin for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of clinically suspected multi-drug resistance tuberculosis cases

Kheira Guenaoui<sup>1</sup>, Noria Harir<sup>1</sup>, Aissa Ouardi<sup>2</sup>, Soumia Zeggai<sup>1</sup>, Feriel Sellam<sup>1</sup>, Farid Bekri<sup>2</sup>, Sakina Cherif Touil<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of molecular microbiology, proteomics and Health, Department of Biology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbes, Sidi Bel Abbès, Algeria; <sup>2</sup>Department of Pneumophtisiology (point B), CHU Oran, Oran, Algeria; <sup>3</sup>Department of Biological Hematology, Tenon Hospital, Paris, France

**Contributions:** (I) Conception and design: K Guenaoui, N Harir, F Sellam; (II) Administrative support: S Zeggai; (III) Provision of study materials or patients: F Bekri, S Cherif Touil; (IV) Collection and assembly of data: K Guenaoui, S Zeggai; (V) Data analysis and interpretation: K Guenaoui, N Harir; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

**Correspondence to:** Noria Harir, PhD. Department of Biology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbes, Algeria. Email: harirnouria@yahoo.fr.

**Background:** Multi-drug resistance (MDR) TB is defined as tuberculosis (TB) disease caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) that was resistant to at least isoniazid and rifampicin (RIF). Emerging Multidrug-Resistant TB is one of the major concerns of health policy and rapid detection of *M. tuberculosis* and detection of RIF resistance in infected patients are essential for disease management. The aim of this study was to evaluate patterns of RIF resistance in cases of sputum positive pulmonary TB by using GeneXpert MTB/RIF and comparing between phenotypic and genotypic testing of RIF resistance in MTB strains of clinically suspected MDR-TB isolated cases in western Algeria.

**Methods:** In this study 50 sputum positive cases of pulmonary TB who were potential MDR suspect were included. Their sputum samples were collected and subjected to sputum smear microscopy, culture and conventional MTB/RIF test followed by GeneXpert MTB/RIF assay.

**Results:** Of total 50 cases included in this study, MTB was detected in all patients (100%) by GeneXpert MTB/RIF. However, RIF's resistance was detected in only 21 cases (42%) by GeneXpert MTB/RIF. All RIF resistant strains detected by GeneXpert MTB/RIF were phenotypically confirmed as MDR strains. 42.85% of cases were retreatment failure cases, retreatment cases smear positive at 4 months were 23.82%. While 19.05% of cases were retreatment cases smear positive at diagnosis, and 14.28% patient had history of contact with MDR-TB. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of Xpert MTB/RIF to detect RIF resistance in comparison to conventional phenotypic drug susceptibility technique were found equal to the rates of 100%, 100%, 100% and 100%, respectively.

**Conclusions:** GeneXpert MTB/RIF assay is efficient and reliable technique for the rapid diagnostic of TB. Its simplicity, high sensitivity and specificity for RIF resistance detection make this technique a very attractive tool for diagnostic of MTB and RIF resistance in MDR cases.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis* (MTB); rifampicin resistance; multi-drug resistance (MDR); GeneXpert MTB/RIF

Submitted Mar 24, 2016. Accepted for publication Apr 06, 2016.

doi: 10.21037/atm.2016.05.09

**View this article at:** <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2016.05.09>

## Introduction

Tuberculosis (TB) is the most common infectious disease worldwide caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

In the global TB report [2014], WHO reported that in 2013, nine million people developed TB. At the same time, global burden of multidrug-resistant TB (MDR-TB) was estimated to be 480,000 cases leading to estimated 210,000 deaths (1). In Africa, 1.9% of new cases and 9.4% of diagnosed and treated patients are infected by an MDR strain (2). Multi-drug resistance (MDR) TB is defined as TB disease caused by a strain of *M. tuberculosis* that was resistant to at least isoniazid and rifampicin (RIF) (3). Emerging Multidrug-Resistant Tuberculosis-TB is one of the major concerns of health policy (4). Currently, less than 10% of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) cases in the world are detected (5). The rapid detection of *M. tuberculosis* in infected patients is essential for disease management (6). During the past few years, molecular methods have been developed to identify drug resistance causing gene mutations (7,8). One of the latest techniques is GeneXpert MTB/RIF, which can detect mutations in the *rpoB* gene only; due to close association of RIF resistance and MDR TB, this technique has been used to detect MDR TB cases (9). The technique has been thoroughly evaluated (10) and used in many countries (11). It has a sensitivity and specificity of 90.4% and 98.4%, respectively (12,13).

Culture is the “gold standard” for final determination, but it is time consuming and may take up 2 till 8 weeks (6). Molecular tests dramatically shorten diagnosis time from months to days (MTBDRplus) or even hours (GeneXpert MTB/RIF). The assay can generally be completed in less than 2 hours (14,15).

The objectives of this study were to use cartridge based nucleic acid amplification testing to evaluate patterns of RIF resistance in cases of sputum positive pulmonary TB and compare between phenotypic and genotypic testing of RIF resistance in MTB strains of clinically suspected MDR-TB isolated cases in western Algeria.

## Methods

A prospective study was conducted at pneumophthisiology department (B) at Oran hospital (western Algeria) along the period of 2013 to 2014. The material of study came from different hospital centers and different public health sectors of western Algeria. Fifty clinically suspected MDR-TB cases

were selected. An absolute confidentiality of the patients' vital information was maintained for ethical purposes and an ethical approval was obtained from the institution in which the study was carried out.

The following variables were collected through an administered questionnaire during sputum collection: sex, age, treatment history (new or previously treated). Inclusion criteria used for MDR suspect consist of retreatment failure, retreatment cases sputum positive at 4 months, contact of known MDR-TB case, sputum positive retreatment case at diagnosis.

After identifying potential MDR-TB suspect cases, three sputum samples were collected from each patient. One specimen was used for direct microscopic examination by Ziehl-Neelsen method, one specimen was processed with N-acetyl-L-cysteine and sodium hydroxide before solid culture, and MTB/RIF test. The last specimen was used for direct testing with the Xpert MTB/RIF test. Xpert MTB/RIF assay was compared with conventional culture method for detecting TB and with conventional phenotypic drug susceptibility testing for detecting RIF's resistance. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All authors declare that ‘written informed consent was obtained from the patient (or other approved parties) for publication of this case report and accompanying images.

### *Phenotypic drug susceptibility testing*

Cultures obtained on Lowenstein-Jensen medium were collected and tested for drug susceptibility to RIF, isoniazid, ethambutol and streptomycin. Drug susceptibility testing was performed using the proportional method with Lowenstein-Jensen medium. The critical drug concentrations were 0.2 µg/mL for isoniazid, 40 µg/mL for RIF, 2 µg/mL for ethambutol and 4 µg/mL for streptomycin. The critical proportion of resistant bacillus necessary to define a resistant strain is 1% for the four tested drugs (15).

### *Genotypic drug susceptibility testing*

For each of the samples; unscrew lid of sputum collection container; add Sample Reagent 2:1 (v/v) to the sample,

**Table 1** Rifampicin sensitivity pattern

Sex	Rifampicin		Total (%)	P value
	Rifampicin resistant (%)	Rifampicin sensitive (%)		
Male	15 (42.9)	20 (57.1)	35 (100.0)	0.8
Female	6 (40.0)	9 (60.0)	15 (100.0)	
Total	21 (42.0)	29 (58.0)	50 (100.0)	

**Table 2** Distribution of Rifampicin resistant cases according to patients' category

Category	Number of cases	Percentage (%)
Retreatment failure	9	42.85
Retreatment cases sputum positive at 4 months	5	23.82
Contact of known MDR-TB case	4	14.28
Sputum positive retreatment case at diagnosis	3	19.05
Total	21	100

MDR-TB, multi-drug resistant tuberculosis.

replace the lid, and shake vigorously 10–20 times. Incubate for 15 minutes at room temperature. At one point between 5 and 10 minutes of the incubation again shake the specimen vigorously 10–20 times. Samples should be liquefied with no visible clumps of sputum. Particulate matter may exist that is not part of the sample. At least 2 mL of processed sample was taken with the plastic transfer pipette from the collection container to the single-use, disposable, self-contained GeneXpert cartridge. Then it was subjected to GeneXpert® MTB/RIF to create a test. Results were noted after 2 hours.

## Results

In this study, 50 clinically suspected MDR-TB cases were selected and their sputum samples were tested by phenotypic drug susceptibility methods and genotypic drug susceptibility methods using the test GeneXpert MTB/RIF.

Of total 50 cases included in this study, MTB was detected in all patients (100%) by GeneXpert MTB/RIF.

**Table 3** Prevalence of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB)

Xpert MTB/RIF	DST			MDR-TB	P value
	RIF resistant	RIF sensitive	Isoniazid resistant		
RIF resistance detected	21	0	21	21	0.001
RIF resistance not detected	0	29	0	0	
Total	21 (100%)	29 (100%)	21 (100%)	21 (100%)	

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; DST, drug susceptibility testing; RIF, rifampicin.

However, RIF's resistance was detected in only 21 cases (42%) by GeneXpert MTB/RIF. Gender distribution showed that 15 (71.43%) were male and 6 (28.57%) were female among RIF resistant cases (*Table 1*). The sex ratio was of 2.5. The distribution according to age showed that the majority of patients with RIF resistance belonged to age group of 31–40 years (n=10; 47.62%) followed by 21–30 and 41–50 years with (n=4; 19.04%) for each age group and 51–60 years with (n=3; 14.28%).

*Table 1* shows that 15 (42.9%) male out of 35 and 6 (40.0%) female out of 15 were resistant to RIF, while 20 (57.1%) male out of 35 and 9 (60.0%) female out of 15 were sensitive to it.

42.85% of cases were retreatment failure cases, retreatment cases smear positive at 4 months were 23.82%. While 19.05% of cases were retreatment cases smear positive at diagnosis, and 14.28% patient had history of contact with MDR-TB (*Table 2*).

Comparison of phenotypic and genotypic resistance drug susceptibility showed that all strains harboring mutations in *rpoB* were phenotypically resistant to RIF and isoniazid. Our results show that all RIF resistant strains detected by GeneXpert MTB/RIF were phenotypically confirmed as MDR strains (*Table 3*).

Twenty one cases were identified as being RIF resistant MTB by the conventional method. On comparing this with Xpert MTB/RIF; we noted a total of twenty one cases that are RIF resistant MTB. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of Xpert MTB/RIF to detect RIF resistance in comparison to conventional phenotypic drug susceptibility technique were

**Table 4** Performance characteristics of the Xpert MTB/RIF assay compared to drug susceptibility testing for rifampicin (RIF)

Xpert MTB/RIF	DST		PPV	NPV
	RIF resistant	RIF sensitive		
RIF resistance detected	21	0	100%	
RIF resistance not detected	0	29		100%
Sensitivity	100%			
Specificity		100%		

DST, drug susceptibility testing; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NPV, negative productive value; PPV, positive productive value.

found equal to the rates of 100%, 100%, 100% and 100%, respectively (Table 4).

## Discussion

In this study our objectives were to use cartridge based nucleic acid amplification testing to evaluate patterns of RIF resistance in cases of sputum positive pulmonary TB and to compare between phenotypic and genotypic testing for resistance to RIF in MTB strains of clinically suspected MDR-TB cases.

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is defined as TB caused by strains of *M. tuberculosis* that are resistant to at least isoniazid and RIF (15). Mono-resistance to RIF is rare; however, 90% of RIF resistant isolates also exhibit resistance to isoniazid. Therefore, the detection of RIF resistance may serve as a surrogate marker for MDR *M. tuberculosis* (16). For RIF resistance detection, Xpert® MTB/RIF provides accurate results and can allow rapid initiation of MDR-TB treatment (17).

In our study, 21 (42%) were RIF resistant, while 29 (58%) were RIF sensitive. This is similar to that reported by Trivedi (18) and Shah (19) where (37.3%) and (37.47%) were resistant to RIF respectively, but lower to the study of Chowgule who reported a very high incidence of RIF resistance of (66.8%) (20). This level of resistance was superior to the study of Rasaki *et al.* (21), Olusoji *et al.* (22), Lawson *et al.* (23), Ganguly *et al.* (6), where (7.2%), (8.6%), (19%), (29.87%) isolates were resistance to RIF respectively and Idigbe *et al.* (24) who reported only 2% of resistance to RIF in Lagos, Nigeria. However, no strain of RIF resistant

was reported in the findings of Rasaki *et al.* (21).

There was male preponderance, 15 (71.43%) as against 6 (28.57%) female; this was in concord with the work of Ganguly *et al.* (6) where male subjects had prevalence of 85.71% as against 14.29% of females. Similarly, a European study by Faustini *et al.* (25) observed more drug resistant TB cases among men. This disparity could be due to the fact that male subjects were more exposed to risk factors of TB infection.

In the present study, the distribution according to age showed that the majority of patients with RIF resistance belonged to age group of 31–40 years (n=10; 47.62%) followed by 21–30 and 41–50 years with (n=4; 19.04%) for each age group. This was in concord with the study of Thomas *et al.* (26). In TRC, Chennai, 70% of the drug resistant patients were male and their mean age was 37. In a another study done by Robert *et al.* (27) the age and the sex distribution was similar to the study of Ganguly *et al.* (6) where maximum number of patients with RIF resistance were male and were in the age group of 21–30 years (26.53%) followed by 31–40 years (22.44%).

In our analyzed cohort, 42.85% of cases were retreatment failure cases, Retreatment (Previously CAT II) failure cases were found to be 41.83% among RIF resistant in the study of Ganguly *et al.* (6). In a study done by Sharma *et al.* (28) it was found that 34% of Cat- II failures were drug resistant which is similar to our study. A high prevalence of MDR-TB in Cat-II failure is not restricted to India and has been documented in Vietnam (29), Thailand (30) and Rowanda (31). Retreatment cases smear positive at 4 months were 23.82%, this level was superior to the study of Ganguly *et al.* (6) where retreatment cases smear positive at 4 months found to be 8.16% among RIF resistant cases. 19.05% of cases were retreatment cases smear positive at diagnosis. In studies by Sharma *et al.* (28) and Ganguly *et al.* (6) drug resistance was respectively found in 20% and 22.44% of Retreatment cases at diagnosis which is similar to our study. Ganguly *et al.* (6) found only one resistant case (1.02%) with history of contact with MDR TB. This is consistent with a study done by Singla *et al.* (32) in which only 0.66% of contacts developed MDR-TB. This was lower than what we found in our study where 14.28% patient presented history of contact with MDR-TB.

According to the World Health Organization (WHO) 650,000 people are infected worldwide and 12 million suffer from TB. In Africa, 1.9% of new cases and 9.4% of diagnosed and treated patients are infected by MDR strain (2). The results of this study showed that all strains

harboring mutations in *rpoB* were phenotypically MDR-TB strains (resistant to RIF and isoniazid). This was comparable to 77.4% reported by Olusoji *et al.* (22). Few studies had documented the presence of cases infected by MDR strains in Nigeria, with prevalent rates ranging from 4–76.3% (33,34), but was much superior to the results found by Rasaki *et al.* (21) where forty four (31.4%) were positive and to another rates published in previous studies from India (18,35).

Compared to phenotypic DST, the MTB/RIF test correctly identified 21 of 21 patients (100% sensitive) with RIF-resistant bacteria and 29 of 29 (100% specific) with RIF-sensitive bacteria, this is similar to results showed in study conducted in Uganda where 64 smear-positive culture-positive sputa from patients previously treated for TB were tested and the Xpert MTB/RIF test detected nine of nine (100% sensitivity) cases of RIF resistance. RIF resistance was excluded in 55/55 susceptible cases—100% specificity (14). In a recent multicentre (Peru, Azerbaijan, South Africa and India) evaluation study of 1,730 patients with suspected drug-sensitive or multidrug-resistant pulmonary TB, the MTB/RIF test identified 200 of 205 patient (97.6% sensitive) with RIF-resistant bacteria and 504 of 514 (98.1% specific) with RIF-sensitive bacteria (36). In the study of Darwish *et al.* (37) the Xpert MTB/RIF revealed five out of the six cases as being RIF resistant MTB by the conventional method to be RIF resistant MTB with sensitivity 83% and specificity with 100%. Steingart *et al.* (17) emphasized that Xpert can be used as an initial diagnostic test for TB detection and RIF resistance in patients suspected of having TB, MDR-TB or HIV-associated TB.

## Conclusions

The high sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF for RIF resistance detection support its use as an initial diagnostic test for RIF resistance. Therefore, implementation of molecular approaches for direct diagnosis of MDR TB, as a part of routine analysis in the laboratories of health care institutions, would be of great benefit in adapting treatment regimens, limiting dissemination of MDR TB strains.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the members of Pneumophysiology Department (B) of Oran Hospital.

## Footnote

*Conflicts of Interest:* The authors have no conflict of interest to declare.

## References

1. Tuberculosis. WHO Global Tuberculosis Report 2014. Available online: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr14\\_executive\\_summary.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_executive_summary.pdf)
2. WHO. Epidemiological fact sheets on HIV and AIDS, 2008 update: Core data on epidemiology and response. Djibouti. Who globalatlas.
3. WHO (2000). Anti-Tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis drug Resistance Surveillance (Fourth global report) (WHO/HTM/TB/2008.394).
4. WHO (2011). Global Tuberculosis Control.
5. WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response; 2010. Available online: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf)
6. Ganguly J, Ray S, Nandi S, et al. A study to evaluate pattern of rifampicin resistance in cases of sputum positive pulmonary tuberculosis. *J of Evolution of Med and Dent Sci* 2015;4:4762-8.
7. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, et al. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J Microbiol Methods* 2008;75:1-11.
8. García de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:349-59.
9. World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test (technical and operational 'how-to' practical considerations): WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011. Available online: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569_eng.pdf), accessed August 23, 2013.
10. Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011;49:1621-3.
11. Barnard M, Warren R, Gey Van Pittius N, et al. Genotype MTBDRsl line probe assay shortens time to diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis in a high-throughput diagnostic laboratory. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:1298-305.
12. Chang K, Lu W, Wang J, et al. Rapid and effective diagnosis

- of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. *J Infect* 2012;64:580-8.
13. Zakhm F, Chaoui I, Echchaoui AH, et al. Direct sequencing for rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Morocco. *Infect Drug Resist* 2013;6:207-13.
  14. Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 2010;48:229-37.
  15. David H, Lévy-Frédault V, Thorel MF. Méthodes de Laboratoire pour Mycobactériologie Clinique. Institute Pasteur, Paris, 1989:85.
  16. Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, et al. Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear-negative microscopy results. *J Clin Microbiol* 2011;49:3068-70.
  17. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014;1:CD009593.
  18. Trivedi SS, Desai SG. Primary antituberculosis drug resistance and acquired rifampicin resistance in Gujarat, India. *Tubercle* 1988;69:37-42.
  19. Shah AR, Agarwal SK, Shah KV. Study of drug resistance in previously treated tuberculosis patients in Gujarat, India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:1098-101.
  20. Chowgule RV, Deodhar L. Pattern of secondary acquired drug resistance to antituberculosis drug in Mumbai, India—1991-1995. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 1998;40:23-31.
  21. Rasaki SO, Ajibola AA, Musa SA, et al. Rifampicin Resistant Tuberculosis in a Secondary Health Institution in Nigeria, West Africa. *J Infect Dis Ther* 2014;2:139.
  22. Olusoji D, Eitayeb O, Olanrewaju O, et al. Global Advanced Research. *J Microbiol* 2013;2:022-025.
  23. Lawson L, Habib AG, Okobi MI, et al. Pilot study on multidrug resistant tuberculosis in Nigeria. *Ann Afr Med* 2010;9:184-7.
  24. Idigbe O, Sofola T, Akinosho R, et al. Initial drug resistance tuberculosis amongst HIV seropositive and seronegative prison inmates in Lagos, Nigeria. *Int Conf AIDS* 1998;12:137.
  25. Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 2006;61:158-63.
  26. Thomas A, Ramachandran R, Rehaman F, et al. Management of multi drug resistance tuberculosis in the field: Tuberculosis Research Centre experience. *Indian J Tuberc* 2007;54:117-24.
  27. Robert J, Trystram D, Truffot-Pernot C, et al. Multidrug-resistant tuberculosis: eight years of surveillance in France. *Eur Respir J* 2003;22:833-7.
  28. Sharma SK, Kumar S, Saha PK, et al. Prevalence of multidrug-resistant tuberculosis among category II pulmonary tuberculosis patients. *Indian J Med Res* 2011;133:312-5.
  29. Quy HT, Lan NT, Borgdorff MW, et al. Drug resistance among failure and relapse cases of tuberculosis: is the standard re-treatment regimen adequate? *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:631-6.
  30. Yoshiyama T, Yanai H, Rhiengtong D, et al. Development of acquired drug resistance in recurrent tuberculosis patients with various previous treatment outcomes. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:31-8.
  31. Rigouts L, Portaels F. DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* do not change during the development of resistance to various antituberculous drugs. *Tuber Lung Dis* 1994;75:160.
  32. Singla N, Singla R, Jain G, et al. Tuberculosis among household contacts of multidrug-resistant tuberculosis patients in Delhi, India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:1326-30.
  33. Dosumu EA, Osagie K, Shuaib A, et al. Multidrug resistant tuberculosis at the national hospital, Abuja Nigeria. *Afr J Respir Med* 2008;4:22-3.
  34. Daniel O, Osman E. Prevalence and risk factors associated with drug resistant TB in South West, Nigeria. *Asian Pac J Trop Med* 2008;4:148-51.
  35. Jain NK, Chopra KK, Prasad G. Initial and acquired isoniazid and rifampicin resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and its implication for treatment. *Indian J Tuberc* 1992;39:121-4.
  36. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363:1005-15.
  37. Darwish M, Abd El Wadood M, ALnagdi H. Diagnostic assessment of Xpert MTB/RIF in a sample of *Mycobacterium tuberculosis* Egyptian patients. *Afr J Microbiol Res* 2013;7:5107-13.

**Cite this article as:** Guenaoui K, Harir N, Ouadi A, Zeggai S, Sellam F, Bekri F, Cherif Touil S. Use of GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/rifampicin for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of clinically suspected multi-drug resistance tuberculosis cases. *Ann Transl Med* 2016;4(9):168. doi: 10.21037/atm.2016.05.09



*Références  
bibliographiques*

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Ainsa J. A., Perez E., Pelicic V., Berthet F. X., Gicquel B. et Martin C.** (1997). Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2')*-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')*-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*;24: 431-441.
- Ait-Khaled N., Enarson D.** (1999). Tuberculose: Manuel pour les étudiants en médecine [en ligne]. Paris et Genève: Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladie Respiratoires / Organisation Mondiale de la Santé. 149 p. [consulté en janvier 2011].[http://www.tbrieder.org/publications/books\\_french/students\\_fr.pdf](http://www.tbrieder.org/publications/books_french/students_fr.pdf)
- Alangaden G.J., Manavathu E.K., Vakulenko S.B., Zvonok N.M., Lerner S.A.** (1995). Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. *Antimicrob Agents Chemother*; 39:1700- 1703. 17.
- Alcaide F., Pfyffer G.E., Telenti A.** (1997). Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:2270-2273.
- Aleyamma T. et al.** (2007). Management of Multi Drug Resistance Tuberculosis in the Field: Tuberculosis Research Centre Experience. *Ind J Tuberc*; 54: 117-24.
- Al-Orainey I. O.** (2009) Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? *Ann Thorac Med*;4: 5-9.
- American Thoracic Society (ATS).**(1966). Treatment of drug-resistant tuberculosis.A statement by the Committee on Therapy. *Am Rev Respir Dis*; 94: 125–127.
- American Thoracic Society (ATS).** (2000). Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*; 161:1376-1395.
- Andersen P., Doherty T.M.** (2005). The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat RevMicrobiol*; 3: 656-662.
- Aranaz A., Liebana E., Gomez-Mampaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., et al.**(1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* ; 49:1263-1273.
- Aronson N.E., Santosham M., Comstock G.W., Howard R.S., Moulton L.H., Rhoades E.R., et al.** (2004). Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. *JAMA*; 291:2086-2091.
- Ayele W.Y., Neill S.D., Zinsstag J., Weiss M.G., Pavlik I.** (2004). Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*; 8:924-937.

- Bagdadi M., Lazraq R., Ibrahimy S., Bouayad Z., Guinet R et Benslimane A.**(1997).Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *IntJtuberc Lung Dis*; 1: 309-313.
- Balasubramanian K.S. Um, Wilson T., Collins D., de Lisle G., W.R. Jacobs Jr.** (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid andethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*; 263:227-230.
- Basso L.A., Zheng R., Musser J.M., W.R. Jacobs Jr, Blanchard J.S.** (1998). Mechanisms ofisoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoylreductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis*; 178:769-775.
- Baulard A.R., Betts J.C., Engohang-Ndong J., Quan S., McAdam R.A., Brennan P.J., et al.**(2000). Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem*; 275:28326-28331.
- Baydur A.** (1977).The spectrum of extrapulmonary tuberculosis.*West J Med*;126: 253-262.
- Beggs C. B., Noakes C. J., Sleigh P. A., Fletcher L. A. et Siddiqi K.** (2003). The transmission of tuberculosis in confined spaces: an analytical review of alternative epidemiological models. *Int J Tuberc Lung Dis*;7: 1015-1026.
- Benedek T. G.,** (2004).The history of gold therapy for tuberculosis.*J Hist Med Allied Sci*;59:50-89.
- Bernstein J., LottW. A., Steinberg B. A. et Yale H. L.** (1952) Chemotherapy ofexperimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and relatedcompounds. *Am Rev Tuberc*; 65: 357-364.
- Bocchino M., Bellofiore B., Matarese A., Galati D. et Sanduzzi A.** (2009) IFN-gamma release assays in tuberculosis management in selected high-risk populations. *Expert RevMolDiagn*; 9: 165-177.
- Boehme C.C., Nabeta P., Hillemann D., et al.** (2010). Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*; 363: 1005–1015.
- Boehme C.C., Nicol M.P., Nabeta P., 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 multicentre implementation study. *Lancet*;377: 1495–1504.
- Bonard D., Msellati P., Rigouts L., Combe P., Coulibaly D., Coulibaly I.M., Portaels F.** (2000). What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*? *Int J Tuberc Lung Dis*; 4:1176-1180.
- Cambau E., Lemaitre N., Sougakoff W. et Jarlier V.** (2003). Résistance aux antituberculeux. *Antibiotiques* 5: 29-37.
- Caminero J. A.** (2006). Treatment of multidrug-resistant tuberculosis: evidence and controversies. *Int J Tuberc Lung Dis*; 10: 829–837.

- Caminero J.A.**(2008). Extensively drug-resistant tuberculosis: is its definition correct? (Correspondence). *EurRespir J*; 32:1413–1415.
- Cavanagh R., Begon M., Bennett M., Ergon T., Graham I.M., De Haas P.E., et al.**(2002). *Mycobacterium microti*infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. *J ClinMicrobiol*; 40:3281-3285.
- CDC.** (1992). Update: Availability of streptomycin and para-aminosalicylic acid – United states. *Morbidity and Mortality Weekly Report(MMWR)*;41: 482.
- CDC.**(2006).Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis.*Morbidity and Mortality Weekly Report(MMWR)*; 55:1176.
- Chan E. D. et Iseman M. D.**(2008). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *CurrOpin Infect Dis*; 21: 587-595.
- Chowgule R.V., Deodhar L.** (1998). Pattern of secondary acquired drug resistance to antituberculosis drug in Mumbai, India -1991-1995.*Indian J Chest Dis Allied Sci*; 40: 23-31.
- Clark-Curtiss J.E., Haydel S.E.** (2003). Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis.*Annu Rev Microbiol*; 57:517-549.
- Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., et al.**(1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.*Nature* ; 393: 537-544.
- Consensus Scientifique sur la Tuberculose Source: OMS (2008)**<http://www.greenfacts.org/fr/tuberculose/tuberculose-greenfacts-level2.pdf>
- Corbett E.L., Watt C.J., Walker N., Maher D., Williams B.G., Raviglione M.C., Dye C.**(2003). The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic.*Arch Intern Med*; 163:1009-1021.
- Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S.** ( 2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov.*Int J SystEvolMicrobiol*; 53:1305-1314.
- Cynamon M.H., Klemens S.P.**(1989). Nextantimycobacterial agents. *Clinics in Chest Médecine* ; 10:355-64.
- Daniel T.M.**(2005). Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis.*Int J Tuberc LungDis*; 9:1181-1182.
- Daniel T.M.** (2006). The history of tuberculosis. *Respir Med*; 100:1862-1870.
- Daniel O., Osman E.**(2011). Prevalence and risk factors associated with drug resistant TB in South West, Nigeria. *Asian Pac J Trop Med*; 4: 148-151.

- Darwish M., Abd El Wadood M., ALnagdi H.** (2013). Diagnostic assessment of Xpert MTB/RIF in a sample of *Mycobacterium tuberculosis* Egyptian patients. *African Journal of Microbiology Research*; 7 (44): 5107-5113.
- Davies J.** (1998). Antibiotic resistance in mycobacteria. In: *Genetics and Tuberculosis*. D. J. Chadwick & G. Cardew (eds). Chichester: John Wiley, pp. 195-208.
- Davies A.P., Billington O.J., McHugh T.D., Mitchison D.A., Gillespie S.H.** (2000). Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*; 38:3686-3688.
- DeBarber A.E., Mdluli K., Bosman M., Bekker L.G., 3rd Barry C.E.** (2000). Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:9677-9682.
- de Jong B.C., Hill P.C., Brookes R.H., Out J.K., Peterson K.L., Small P.M., Adegbola R.A.** (2005). *Mycobacterium africanum*: a new opportunistic pathogen in HIV infection? *AIDS*; 19:1714-1715.
- de Jong B.C., Antonio M., Awine T., Ogungbemi K., de Jong Y.P., Gagneux S.** (2009). Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in The Gambia. *J Clin Microbiol* ; 47:994-1001.
- de Jong B.C., Antonio M., Gagneux S.** (2010). *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*; 4:744.
- de Jong B.C., Adetifa I., Walther B., Hill P.C., Antonio M., Ota M., Adegbola R.A.** (2010). Differences between tuberculosis cases infected with *Mycobacterium africanum*, West African type 2, relative to Euro-American *Mycobacterium tuberculosis*: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 58:102-105.
- de la Rua-Domenech R.** (2006). Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86:77-109.
- De Logu, A., Onnis V., Saddi B., Congiu C., Schivo M. L. & Cocco M. T.** (2002). Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*; 49: 275-282.
- Deng L., Mikusova K., Robuck K.G., Scherman M., Brennan P. J. & McNeil M. R.** (1995) Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 694-701.
- Dominique L.** (2007). Resistance de *Mycobacterium tuberculosis*. *Médecine/Science*; 23:205-9.
- Dosumu E.A, Osagie K., Shuaib A., Lawson L.** (2008). Multidrug resistant tuberculosis at the national hospital, Abuja Nigeria. *Afr J Respir Med*; 4: 22-23.

- Dutau G.** (2005). The history of tuberculosis. *Arch Pediatr* **12 Suppl 2**: S88-95.
- Dye C., Shaele S., Dolin P., Pathani V., Raviglione M.C.** (1999). Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* ; 282:677–686.
- FARES.** (2006) Guide théorique à l'intention des intervenants. [http://www.fares.be/documents/guide\\_theorique2006.pdf](http://www.fares.be/documents/guide_theorique2006.pdf).
- Faustini A., Hall A.J., Perucci C.A.** (2006). Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review *Thorax*; 61: 158–163.
- Finken M., Kirschner P., Meier A., Wrede A., Böttger E.C.** (1993). Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol*; 9:1239-1246.
- Fox H. H.** (1952) .The chemical approach to the control of tuberculosis. *Science*; 116: 129- 134.
- Francis J.**(2011). Curry National Tuberculosis Center and California Department of Public Health, *Drug-Resistant Tuberculosis, A Survival Guide for Clinicians*, Second Edition.
- Ganguly J., Ray S., Nandi S., Halder S., Kundu S., Mandal A.** (2015)..A study to evaluate pattern of rifampicin resistance in cases of sputum positive pulmonary tuberculosis. *J of Evolution of Med and Dent Sci*/eISSN- 2278-4802, pISSN- 2278-4748/ Vol. 4/ Issue 28/ Apr 06, 2015.
- Gerome P., Fabre M., Koeck J.** (2003). Les méthodes d'étude de la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. *Revue Française des laboratoires* ; 65-74.
- Grosset J.**(1990). Bacteriologic basis for the treatment of tuberculosis. *Rev Prat*; 40(8):715-718.
- Grumbach F., Canetti G., Le Lirzin M.**(1969). Rifampicine in daily and intermittent treatment of experimental murine tuberculosis with emphasis on late results. *Tubercle*; 50:208-84.
- Gupta Anil M. et al.**(2014). Prevalence of Multi Drug Resistance-TB in Category-2 failure. *Gujarat Medical Journal* March,; 69: 44-47.
- Haas W.H., Bretzel G., Amthor B., Schilke K., Krommes G., Rüsck-Gerdes S., et al.** (1997). Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and west Africa. *J Clin Microbiol*; 35:663-666.
- Hadj, M., Fissah A. et Nafti S.** (2006). Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose. *Rev Mal Respir* ; 23: 10S85-10S87.
- Hawken M.P., Muhindi D.W., Tchakaya J.M., Bhatt S.M., Ng'ang'a T.L.W. et Porter J.T.** (2001). Under-diagnostic of smear-positive pulmonary tuberculosis in Nairobi, Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis*; 5: 360-363.

- Hazbon M.H., Brimacombe M., Bobadilla del Valle M., Cavatore M., Guerrero M.I., Varma-Basil M.** (2006). Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 50:2640-2649.
- Helb D. et al.** (2010) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol*; 48: 229–237.
- Heifets L. et Desmond E.** (2005). Clinical mycobacteriology (tuberculosis) laboratory: services and methods. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp.49-69.
- Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Boehme C, Richter E.** (2011). Rapid molecular detection of extra pulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol*; 49(4):1202-1205.
- Holmes C. B., Hausler H., Nunn P.** (1998). A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*; 2: 96–104.
- Honoré N., Cole S.T.** (1994). Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*; 38:238-242.
- Hooper D.C., Wolfson JS.** (1991). Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med*; 324:384-94.
- Hopewell P. C. et Jasmer R. M.** (2005) Overview of clinical tuberculosis. In: *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 15-31.
- Horo K., Aka-Danguy E., Kouassi Boko A., N'gom A. S., Gode C. V., AhuiBrou J. M. et al.** (2011). Tuberculose multirésistante : à propos de 81 patients suivis dans un service de pneumologie en côte d'ivoire. *Rev Pneumol Clin* ; 67 : 82-8.
- Houndonougbo SY Euloge.** (2011). Tuberculose Pulmonaire Chronique dans le service de pneumo-phtisiologie du CHU du point G. Thèse médecine. Bamako.
- Huchon G.J., Uzzan B.E.** (1982). Pharmacologie des antituberculeux. *Med Hyg* ; 40:1509-20.
- Idigbe O., Sofola T., Akinosho R., Onwujekwe D., Odiah F., et al.** (1998). Initial drug resistance tuberculosis amongst HIV seropositive and seronegative prison inmates in Lagos, Nigeria. *Int Conf AIDS*; 12: 137.
- Inderlied C.B., Salfinger M.** (2001). Antimycobacterial agents and susceptibility tests. *Manual of clinical microbiology*. 7th edition. Washington DC : American society for microbiology. 1601-23.
- Ioannidis P., Papaventsis D., Karabela S., Nikolaou S., Panagi M., Raftopoulou E., et al.** (2011). Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear negative microscopy results. *J Clin Microbiol*; 49: 3068-70.

- Iqbal S., Ahmed R., Adhami S.Z., Mumtaz A.** (2011). Importance of polymerase chain reaction in diagnosis of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis.; 23 (1).
- Iram S., Zeenat A., Hussain S., Yusuf N.W., Aslam M.** (2015). Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - Report from a developing country Pak J Med Sci; Vol. 31 No. 1
- Iseman M.D. et Madsen L.A.** (1989). Drug-resistant tuberculosis. Clin Chest Med; 10: 341-353.
- Jain N.K., Chopra K.K., Prasad G.**(1992). Initial and acquired isoniazid and rifampicin resistance to Mycobacterium tuberculosis and its implication for treatment. Indian J Tuberc; 39: 121-124.
- Jain A. et Dixit P.** (2008). Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? J Biosci; 33: 605-616.
- Jarlier V., Gutmann L. et Nikaido H.** (1991). Interplay of cell wall barrier and betalactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother; 35: 1937-1939.
- Jarlier V. et Nikaido H.** (1994). Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol Lett; 123: 11-18.
- Jassal M. et Bishai W. R.** (2009). Extensively drug-resistant tuberculosis. Lancet Infect Dis; 9: 19-30.
- Ji B., Truffot-Pernot C., Grosset J.** (1991). *In vitro* and *in vivo* activities of sparfloxacin (AT-4140) against *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle; 72: 181-6.
- Jindani, A., Aber V. R., Edwards E. A. et Mitchison D. A.** (1980). The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis; 121: 939-949.
- Kabedi M.J., Kashongwe M., Kayembe J.M., MumbaNgoyi D., Mampasi P., Mbaya P., et al.**(2007). Résistance primaire de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux à Kinshasa, République Démocratique du Congo. Bull Soc Pathol Exot. 100, 4, 275-276
- Kao A. S., Ashford D. A., McNeil M. M., Warren N. G. et Good R. C.** (1997). Descriptive profile of tuberculin skin testing programs and laboratory-acquired tuberculosis infections in public health laboratories. J Clin Microbiol; 35: 1847-1851.
- Kashongwe M., Muyembe-Tamfum J.J., Lurhuma Z., Dijassa D. et kalonda R.** (1995) Résistance primaire aux antituberculeux et infection à VIH à Kinshasa en 1990. *Journal Africain des sciences biomédicales* ; 2, 7-10.
- Kaufmann S. H.** (2002) Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. Ann Rheum Dis; 61 Suppl 2: ii54-58.



- Kim J. Y., Ferraro M. J. et Branda J. A.** (2009). False-negative Results with the Gen-Probe(R) Amplified TM *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test caused by Unrecognized Inhibition of the Amplification Reaction. *J ClinMicrobiol*.
- Kir A., Inci I., Torun T., Atsalihli A., Tahaoglu K.** (2006) Adjuvant resectional surgery improves cure rates in multidrug-resistant tuberculosis. *J Thorac Cardiovascular Surg*;131:693-6.
- Kirihara J. M., Hillier S. L. et Coyle M. B.** (1985). Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTECradiometric system. *J Clin Microbiol*; 22: 841-845.
- Konno K., Kurzmann R., Bird K.T.** (1957). The metabolism of nicotinic acid in Mycobacteria: a method for differentiating tubercle bacilli of human origin from other Mycobacteria. *Am Rev Tuberc* ; 75(4):529-537.
- Konno K., Feldmann F. M. et McDermott W.** (1967).Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am RevRespir Dis*;95: 461-469.
- Kouassi B., Horo K., N'Douba K. A., et al.** (2004) Profil épidémiologique et microbiologique des malades tuberculeux en situation d'échec ou de rechute à Abidjan. *Bull Soc Exot*; **97**: 336–337.
- Kremer K., Glynn J.R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N.** (2004). Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacteriumtuberculosis on the basis of genetic markers. *J ClinMicrobiol*; 42:4040-4049.
- Kritski A., Fiuza de Melo F.A.** (2007). Tuberculosis in Adults. In J.C. Palomino (éd.), S.C. Leao(éd.), and V. Ritacco (éd.). *Tuberculosis 2007.From basic science to patient care*. [Disponiblesur :[www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com)].
- Kuaban C., Bercion R., Noeska J., Cunin P., Nkamsse P. et Ngo Niobe S.** (2000). Anti-tuberculosis drug résistance in the west province of Cameroun.*Int J Tuberc Lung Dis*; 4: 356- 360.
- Kubica T., Rusch-Gerdes S., Niemann S.** (2003). *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol*; 41:3070-3077.
- Lalvani A.** (2007).Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy.*Chest*;131: 1898-1906.
- Lantos A., Niemann S., Mezosi L., Sos E., Erdelyi K., David S., et al.**(2003). Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*subsp.*caprae* in captive Siberian tiger. *Emerg Infect Dis*; 9:1462-1464.
- Lehmann J.** (1946).Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis.*The Lancet*; 247: 15-16.

- Lehmann J.**(1964). Twenty years afterward. Historical notes on the discovery of the anti-tuberculosis effect of para-aminosalicylic acid (PAS) and the first clinical trials (Editorial). *Am Rev Respir Dis*; 90: 953–956.
- Lawn S.D., Nicol M.P.** (2011). Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Fut Microbio*; 6(9):1067-1082.
- Lawson L., Habib A.G., Okobi M.I., Idiong D., Olajide I., et al.** (2010) .Pilot study on multidrug resistant tuberculosis in Nigeria. *Ann Afr Med*; 9: 184-187.
- Levin M. E. et Hatfull G. F.** (1993). *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol*; 8: 277-285.
- Long E. R., Ferebee S. H.**(1950). A controlled investigation of streptomycin treatment in pulmonary tuberculosis. *Public Health Rep*; 65: 1421–1451.
- Lönnroth K., Jaramillo E., Williams B.G., Dye C., et Raviglione M.** (2009). Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med*; 68:2240-2246
- Louw G.E., Warren R.M., Donald P.R., Murray M.B., Bosman M., Van Helden P.D.**(2006). Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis*; 10:802-807
- Martin C., Denis F.**(2007). Mycobactéries. In *Bactériologie Médicales Techniques Usuelles*. Denis F, Ploy MC, Martin C, Blngen E, Quentin R. Masson. 467-489.
- Mandell G.L., Sande M.A.**(1980). Drugs used in the chemotherapy of tuberculosis and leprosy. In: Goodman Gilman A, Goodman LS, Gilman A. *The pharmacological basis of therapeutics*, MacMillan, New York : 1200-21.
- Manuel de la lutte antituberculeuse** (2011) .Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière Direction de la Prévention. Programme National de Lutte Contre la Tuberculose.
- Marttila H.J., Soini H., Huovinen P., Viljanen M.K.** (1996). katG mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob. Agents Chemother*; 40:2187-2189.
- Marttila H.J., Soini H., Eerola E., Vyshnevskaya E., Vyshnevskiy B.I., Otten T.F, et al.**(1998). A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St.Petersburg area in Russia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42:2443-2445.
- Mathys V.** (2010) . Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux. Thèse de Doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles.

- Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M.** (2005). Mutation of tlyA confers capreomycine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 49:571-577.
- McClure W. R. et Cech C. L.** (1978). On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J BiolChem*; 253: 8949-8956.
- Mc Dermott W.** (1947). Streptomycin in the treatment of tuberculosis in humans; pulmonary tuberculosis. *Ann Intern Med*; 27: 989-1027.
- Mc Dermott W. et Tompsett R.** (1954). Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. *Am Rev Tuberc*; 70: 748-754
- Medical Research Council.** (1950). Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and para-aminosalicylic acid. *Br Med J*; 2: 1521.
- Metchock B.G., Notte F.S., Wallace R.J.** (2001). *Mycobacterium. Manual of clinical microbiology*. 7th edition. Washington DC : American society for microbiology : 399-437.
- Meyer C.G., Scarisbrick G., Niemann S., Browne E.N., Chinbuah M.A., Gyapong J., et al.** (2008). Pulmonary tuberculosis: virulence of *Mycobacterium africanum* and relevance in HIV coinfection. *Tuberculosis*; 88: 482-489.
- Meyssonnier V.** (2012). Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. Thèse de doctorat en épidémiologie. L'université PIERRE et MARIE CURIE.
- Mikusova K., Slayden R. A., Besra G. S. et Brennan P. J.** (1995). Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 2484-2489.
- Millet J.** (2011). Evaluation de marqueurs génétiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* combinée à l'utilisation d'outils bioinformatiques : apport en épidémiologie et phylogénie de la tuberculose. Thèse de doctorat en Sciences de la vie, Université des Antilles et de la Guyane.
- Mitchison D. A. et Selkon J. B.** (1956). The bactericidal activities of antituberculous drugs. *Am Rev Tuberc*; 74: 109-116; discussion, 116-123.
- Mitchison D.A.** (1984). Drug resistance in mycobacteria. *Brit Med Bull*; 40 :84-90.
- Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B.** (2002). High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*; 46:1417-1424.
- Morlock G.P., Metchock B., Sikes D., Crawford J.T., Cooksey R.C.** (2003). ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:3799-3805.

- Moure R., Munoz L., Torres M., Santin M., Martin R., Alcaide F.** (2011). Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J Clin Microbiol*; 49: 1137–1139.
- Moutaouakkil Y.** (2014). Etude de la sensibilité aux antibacillaires des isolats du complexe de *Mycobacterium Tuberculosis*. A propos de 36 cas : comparaison des données phénotypiques aux données génotypiques. Thèse de doctorat en sciences médicales. N<sup>O</sup>:81, Rabat, Maroc.
- Moyo S., Verver S., Mahomed H., Hawkrigde A., Kibel M., Hatherill M., et al.** (2010). Age-related tuberculosis incidence and severity in children under 5 years of age in Cape Town, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*; 14:149-154.
- Murray J. F.** (2004). A century of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 169: 1181-1186.
- Myllykallio, H., G. Lipowski, D. Leduc, J. Filee, P. Forterre & U. Liebl, (2002) An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science* **297**: 105-107.
- Musser J.M., Kapur V., Williams D.L., Kreiswirth B.N., van Soolingen D., van Embden J.D.** (1996). Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis*; 173:196-202.
- Nair J., Rouse D.A., Bai G.H., Morris S.L.** (1993). The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* ; 10:521- 527.
- Nardell E. A.** (1989). Tuberculosis in homeless, residential care facilities, prisons, nursing homes, and other close communities. *Semin Respir Infect*; 4: 206-215.
- Nicol M.P., Workman L., Isaacs W., Munro J., Black F., Eley B., Boehme C.C., et al.** (2011). Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* ; 11(11): 819-24.
- Nikaido H., Kim S. H. et Rosenberg E. Y.** (1993) Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol Microbiol*; 8: 1025-1030.
- Olusoji D., Eitayeb O., Olanrewaju O., Olapade G.D.** (2013). *Global Advanced Research Journal of Microbiology*; 2: 022-025.
- O'Reilly L.M., Daborn C.J.** (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis*; **76 Suppl** 1:1-46.
- Otu A., Umoh V., Habib A., Ameh S., Lawson L., et al.** (2013). Drug Resistance among Pulmonary Tuberculosis Patients in Calabar, Nigeria. *Pulm Med*; 235190.
- Ouardi A.** (2013). Prévalence et stratégie de prise en charge de la tuberculose à bacilles multirésistants (MDR-TB) dans l'ouest algérien. Thèse de doctorat en sciences médicales, Oran. Algérie.

- Park S.K., Kim C.T., Song S.D.** (1998). Outcome of chemotherapy in 107 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *Int J Tuberc Lung Dis*; 2:87.
- Patnaik M., Liegmann K., Peter J.B.** (2001). Rapid detection of smear negative *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and sequencing for rifampicin resistance with DNA extracted directly from slides. *J.Clin.Microbiol*; 39:51-52.
- Perdigao J., Macedo R., Malaquias A., Ferreira A., Brum L., Portugal I.** (2009). Genetic analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Lisbon, Portugal. *J Antimicrob Chemother*; 65:224-227.
- Peyron P., Vaubourgeix J., Poquet Y., Levillain F., Botanch C., Bardou F., et al.** (2008). Foam macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog*; 4: e1000204.
- Pheiffer C., Carroll N. M., Beyers N., Donald P., Duncan K., Uys P. et van Helden P.** (2008). Time to detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC systems as a viable alternative to colony counting. *Int J Tuberc Lung Dis*; 12: 792-798.
- Piersimoni C., Scarparo C.** (2003). Relevance of amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol* ; 41 : 5355-65.
- Pinner M.** (1935). Atypical acid fast microorganisms. *Am Rev Tuberc*; 424-445.
- Portugal I., Barreiro L., Moniz-Pereira J., Brum L.** (2004). *pncA* mutations in pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:2736-2738.
- Proding W.M.** (2007). Molecular epidemiology of tuberculosis: toy or tool? A review of the literature and examples from Central Europe. *Wien Klin Wochenschr*; 119:80-89.
- Pym A.S., Brodin P., Majlessi L., Brosch R., Demangel C., Williams A., et al.** (2003). Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat. Med*; 9(5):533-539.
- Quy H.T.W., Lan N.T.N., Borgdorff M.W. et al.** (2003). Drug resistance among failure and relapse cases of TB: is the standard re-treatment regimen adequate? *Int J Tuberc Lung Dis*; 7: 631-636.
- Raizada N., Sachdeva K.S., Nair A.S., Kulsange S., Gupta R.S., Thakur R., et al.** (2015). Catching the missing million: experiences in enhancing TB & DR-TB detection by providing upfront Xpert MTB/RIF testing for people living with HIV in India. *PLoS One* ; 10(2):e0116721.
- Raizada N., Sachdeva K.S., Nair A.S., Kulsange S., Gupta R.S., Thakur R., et al.** (2014). Enhancing TB Case Detection: Experience in Offering Upfront Xpert MTB/RIF Testing to Paediatric Presumptive TB and DR TB Cases for Early Rapid Diagnosis of Drug Sensitive and Drug Resistant TB. *PLoS One*; 9(8):e105346.

- Ramaswamy S., Musser J.M.** (1998). Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update. *Tuber Lung Dis*; 79:3-29.
- Ramaswamy S.V., Reich R., Dou S.J., Jasperse L., Pan X., Wanger A., et al.** (2003). Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:1241-1250.
- Rasaki A. et al.** (2014). Rifampicin Resistant Tuberculosis in a Secondary Health Institution in Nigeria, West Africa. *J Infect Dis Ther*; 2:3.
- Richeldi L.** (2006). An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*; 174: 736-742.
- Rigouts L., Portaels F.** (1994). DNA fingerprints of MTB don't change during the development of resistance to various anti-TB drugs. *Tubercle Lung Dis*; 75: 160.
- Rist N.** (1960). L'activite antituberculeuse de l'ethionamide. *Adv Tuberculosis Res*; 10: 69- 126.
- Runyon E.H.** (1960). Unclassified mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*; 81: 428-9.
- Sabai P., Ti T., Roland J., Thandar H., Hlaing M. et al.** (2003). Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among new tuberculosis patients, Yangon, Myanmar. *Emerg Infect Dis*; 9: 274-276.
- Saltini C.** (2006). Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. *Respir Med*; 100: 2085-2097.
- Sangaré L., Diandé S., Badoum G., Dingtoumda B., Traoré A.S.** (2010) Résistance aux antituberculeux chez les cas de tuberculose pulmonaire nouveaux ou traités antérieurement au Burkina Faso. *Int J Tuberc Lung Dis* ;14(11):1424–1429.
- Schaaf H.S., Gie R.P., Beyers N., Sirgel F.A., Klerk P.J. et Donald R.** (2000). Primary drug-resistant tuberculosis in children. *Int J Tuberc Lung Dis*; 4: 1149-1155.
- Scorpio A., Lindholm-Levy P., Heifets L., Gilman R., Siddiqi S., Cynamon M., Zhang Y.** (1997). Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:540-543.
- Shah A.R., Agarwal S.K., Shah K.V.** (2002). Study of drug resistance in previously treated tuberculosis patients in Gujrat, India. *Int J Tuberc Lung Dis*; 6, 1098–1101.
- Shah N. S., Wright A., Bai G. H., Barrera L., Boulahbal F., Martin-Casabona N.** (2007). Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis*; 13: 380-387.
- Sharma S. K. et al.** (2011). Prevalence of multidrug-resistant tuberculosis among Category II pulmonary tuberculosis patients. *Indian J Med Res*; 133: p 312-315.
- Shean K., Willcox P.** (2006). Multi drug resistant tuberculosis in health care workers, Cape Town, South Africa 37th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (the Union): 261P.

- Sherman D.R., Mdluli K., Hickey M.J., Arain T.M., Morris S.L., Barry 3<sup>rd</sup>C.E., Stover C.K.** (1996). Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*; 272:1641-1643.
- Shinnick T. M. et Good R. C.** (1994). *Mycobacterial taxonomy*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 13: 884-901.
- Sidibé F.** (2009). Problématique de la prise en charge des cas chroniques de tuberculose pulmonaire dans le service de Pneumo phthisiologie du CHU du Point-G. Thèse Med, N°113, Bamako.
- Siddiqui M.A.M., Anuradha P.R., Nagaman K., Vishnu P.H.** (2013). Comparison of conventional diagnostic modalities, BACTEC culture with polymerase chain reaction for diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. *J Med Allied Sci* ; 3(2): 53-58.
- Singla N et al.** (2011). Tuberculosis among household contacts of multidrug-resistant tuberculosis patients in Delhi, India. *Int J Tuberc Lung Dis*. Oct; 15(10): 1326-30.
- Slayden R.A., Barry 3<sup>rd</sup> C.E.** (2000). The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*; 2:659-669.
- Small P. M., Pai M.** (2010). Tuberculosis diagnosis—time for a game change. *N Engl J Med*; 363: 1070–1071.
- Smith I.** (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*; 16: 463-496.
- Snène H., Daghfous H., Ben Saad S. et al.** (2014). La tuberculose multirésistante: état des lieux en Tunisie. *Rev Mal Respir* ; 19: 21-3.
- Soini H., Musser J.M.** (2001). Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* ; 47 : 809-14.
- Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Kreiswirth B.N., Musser J.M.** (1997). Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:636-640.
- Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Deretic V., Musser J.M.** (1997). Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother* ; 41:600-606.
- Sreevatsan S., Stockbauer K.E., Pan X., Kreiswirth B.N., Moghazeh S.L., Jacobs W.R., et al.** (1997). Ethambutol resistance in -1681.
- Steingart K.R., Sohn H., Schiller I., Kloda L.A., Boehme C.C., Pai M., Dendukuri N.** (2013). Xpert MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane database systemic Mycobacterium tuberculosis: critical role of embB mutations*. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:1677 Review.; 31 (1):CD009593. doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub2.

- Steingart K.R., Schiller I., Horne D.J., Pai M., Boehme C.C., Dendukuri N.** (2014). Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev*; 1:CD009593.
- Sun Z., Zhang J., Zhang X., Wang S., Zhang Y., Li C.**(2008). Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*; 31:115-121.
- Tahaoğlu K., Torun T., Sevim T., Atac, G., Kir A., Karasulu L., et al.** (2001). The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey. *N Engl J Med*; 345:170-4.
- Takayama K., Wang L. et David H. L.** (1972). Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*;2: 29-35.
- Takayama K., Schnoes H. K., Armstrong E. L. & Boyle R. W.** (1975). Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Lipid Res*;16: 308-317.
- Takayama K. et Kilburn J. O.** (1989). Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*;33: 1493-1499.
- Takiff H.E., Salazar L., Guerrero C., Philipp W., Huang W.M., Kreiswirth B., et al.**(1994). Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*; 38:773-780.
- Taura D.W., Sale I.T., Mohammed Y.** (2008). The prevalence of tuberculosis in patients attending the infectious diseases hospital, Kano, Nigeria. *Int. Jor.P. App.Scs*; 2: 63-69.
- Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., et al.** (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 341:647-650.
- Telenti A., Philipp W.J., Sreevatsan S., Bernasconi C., Stockbauer K.E., Wieles B., et al.**(1997). The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med*; 3:567-570.
- Thierry D., Brisson-Noel A., Vincent-Levy-Frebault V., Nguyen S., Guesdon J. L. et Gicquel B.**(1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*; 28: 2668-2673.
- Trébuq A., Anagonou S. et Gninason M.** (1999). Primary and acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to antituberculosis drugs in Bénin after 12 years of short-course chemotherapy. *Int J Tuberc Lung Dis*; 3: 466-470.
- Trivedi S. S. et Desai S. G.** (1987). Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis* a test of sensitivity to pyrazinamide. *Tubercle*; 68: 221-224
- Trivedi S.S. et Desai S.C.** (1988). Primary Anti tuberculosis drug resistance and acquired Rifampicin resistance in Gujarat -India. *Tubercle*; 69: 37-42.



- TTC-SNAT, T. T. T. C. o. t. S. N. A. a. T.** (1950). Para-aminosalicylic acid treatment in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc*; 61: 597-612.
- vanDeun A., Martin A., Palomino J.C.** (2010). Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection. *Int J Tuberc Lung Dis*; 14:131-140.
- vanEmbden J. D., Cave M. D., Crawford J. T., Dale J. W., Eisenach K. D., Gicquel B., et al.** (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*; 31: 406-409.
- vanSoolingen D., van der Zanden A.G., de Haas P.E., Noordhoek G.T., Kiers A., Foudraine N.A., et al.** (1998). Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers *J Clin Microbiol* ;36:1840-1845.
- vanSoolingen D., Hoogenboezem T., de Haas P.E., Hermans P.W., Koedam M.A., Teppema K.S., et al.** (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*; 47:1236-1245.
- Vareldzis, B. P., Grosset J., de Kantor I., Crofton J., Laszlo A., Felten M., et al.** (1994). Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. *Tuber Lung Dis*; 75: 1-7.
- Vezeris N., Cambau E., Sougakoff W., Robert J. et Jarlier V.** (2005) Resistance to antituberculous drugs. *Arch Pediatr* **12 Suppl 2**: S102-109.
- Vilcheze C., Jacobs W.R. Jr.** (2007). The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol*; 61:35-50.
- Voladri R. K., Lakey D. L., Hennigan S. H., Menzies B. E., Edwards K. M. et Kernodle D. S.** (1998). Recombinant expression and characterization of the major beta-lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 1375- 1381.
- Wade M.M., Volokhov D., Peredelchuk M., Chizhikov V., Zhang Y.** (2004). Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 49:89-97.
- Webb V., et Davies J.** (1999) Antibiotics and antibiotic resistance in mycobacteria. In: *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence*. C. Ratledge & J. Dale (eds). Oxford, UK Blackwell Science, pp. 287-306.
- Wehrli W., Knusel F., Schmid K. et Staehelin M.** (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U SA*; 61: 667-673.
- Werngren J., Klintz L. et Hoffner S. E.** (2006). Evaluation of a novel kit for use with the BacT/ALERT 3D system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*; 44: 2130-2132.

- WHO.** (1997). Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. *Global Tuberculosis Programme World Health Organisation (WHO) Geneva and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Paris. WHO/TB/96.216.*
- WHO.**(2000). Guidelines for establishing DOTS-Plus pilot projects for the management of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). *WHO/CDS/TB/2000.279.*
- WHO.** (2003). Le traitement de la tuberculose : principes à l'information des programmes nationaux [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 110 p.[consulté en octobre 2010].[http://www.who.int/tb/publications/tb\\_treatmentguidelines/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/tb_treatmentguidelines/en/index.html)
- WHO.** (2004). BCG vaccine. Weekly epidemiological record (WER). 4:25-40.
- WHO.**(2007). The global MDR-TB & XDR-TB response plan 2007–2008. WHO/HTM/STB/2007.2007.387. Geneva, Switzerland: WHO: pp 1–51.
- WHO.** (2008). The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world. Report no. 4. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva, Switzerland: WHO: pp 1– 120.
- WHO.**(2009). Guidelines for surveillance of drug-resistance in tuberculosis – Fourth Edition [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 83 p. [Consulté en juin 2010].[http://www.who.int/tb/publications/mdr\\_surveillance/en/](http://www.who.int/tb/publications/mdr_surveillance/en/)
- WHO.**(2010). The global plan to stop TB 2011-2015 [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 100 p. [consulté en octobre 2010].  
[http://stoptb.org/resources/publications/plans\\_strategies.asp](http://stoptb.org/resources/publications/plans_strategies.asp)
- WHO.** (2010a). Principes pour la prise en charge de la tuberculose à bacilles résistants. WHO/TB/96.
- WHO.**(2010b). Tuberculose Aide mémoire N°104 Novembre 2010.  
<http://www.WHO.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/index.html>
- WHO.**(2010c). Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). global report on surveillance and response. France.
- WHO.** (2011). Automated real-time nucleic acid amplification technology for simultaneous and rapid detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Policy statement. WHO/HTM/TB/2011.4. Geneva, Switzerland: WHO.
- WHO.** (2011a). Policy statement: automated real time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. WHO/HTM/TB/2011.4. Geneva, Switzerland.
- Winder F. G. et Collins P. B.** (1970). Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol;63: 41-48.

- Yew W.W., Chan C.K., Chau C.H., Tam C.M., Leung C.C., Wong P.C., et al.** (2000) . Outcomes of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treated with ofloxacin/levofloxacin containing regimens. *Chest*; 117:744-51.
- Yoshiyama T., Yanai H., Rheingtong D. et al.** (2004). Development of acquired drug resistance in recurrent TB patients with various previous treatment outcomes. *Int J Tuberc Lung Dis*; 8: 31-38.
- Youmans G. P., Raleigh G. W. et Youmans A. S.** (1947). The tuberculostatic action of paraaminosalicylic acid. *J Bacteriol*; 54: 409-416.
- Zakham F., Chaoui I., Hadbae Echchaoui A., Chetioui F., Elmessaoudi My D., Ennaji My M., et al.** (2013). Direct sequencing for rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Morocco. *Infection and Drug Resistance*; 6:207–213.
- Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S.** (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*; 358:591-593.
- Zhang Y., et Telenti A.** (2000). Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In G.F. Hatfull (éd.), W.R. Jacobs, Jr. (éd.). *Molecular genetics of mycobacteria*. Washington, D.C.: ASM Press. p. 235-253.
- Zhang Y. et Mitchison D.** (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*; 7: 6-21.
- Zhang Y., Vilcheze C. et Jacobs W. R.** (2005) Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs Jr (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 115-140.
- Zhang Y., Yew W.W.** (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*; 13:1320-1330.