

Performances diagnostiques du test GenoType® MTBDRsl V2 dans la détection de la tuberculose ultra-résistante chez les patients avec ou sans co-infection par le VIH à Bamako, Mali

Diagnostic performance of the GenoType® MTBDRsl V2 test in the detection of extensively drug-resistant tuberculosis in patients with or without HIV co-infection in Bamako, Mali

Diarra B¹, Degoga B¹, Sarro YS¹, Maiga A², Baya B^{1,3}, Fofana DB¹, Drame HB¹, Traore FG¹, Togo ACG¹, Tolofoudie M¹, Coulibaly G¹, Sanogo F¹, Ballo N¹, Somboro A¹, Kone M¹, Sanogo M¹, Coulibaly N¹, Niare O¹, Traore AB⁴, Tangara CO¹, Maiga AI¹, Guindo I⁴, Toloba Y³, Dao S^{1,5}, Diakite M¹, Doumbia S¹

¹Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC), Université des Sciences, des Techniques, et des Technologies de Bamako (USTTB), Bamako, Mali.

²Service du laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire du Point-G, Bamako, Mali

³Service de Pneumo-Phtisiologie, Centre Hospitalier Universitaire du Point-G, Bamako, Mali

⁴Laboratoire de référence des mycobactéries (LNR), Institut National de Santé Publique (INSP), ministère de la Santé et du Développement Social, Bamako, Mali.

⁵Service des maladies infectieuses et tropicales, Centre Hospitalier Universitaire du Point-G, Bamako, Mali

***Auteur correspondant :** Dr Bassirou Diarra, Enseignant-Chercheur et Responsable du laboratoire P3 de Mycobactériologie et des Fièvres Hémorragiques de l'ucrc. BP 5445, E-mail : bdiarra@icermali.org.

Résumé

Introduction : le diagnostic rapide de la tuberculose résistante à la rifampicine (TB-RR) ou multirésistante (TB-MR), associé au traitement antituberculeux de 2^{ème} ligne reste un élément important dans la lutte contre la tuberculose pharmaco-résistante (TB-PR). L'objectif de ce travail était d'évaluer la performance diagnostique du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 dans la détection de la TB-PR à Bamako, Mali à partir de l'ADN récupéré de la cartouche Xpert® MTB/RIF par rapport à la méthode de référence. **Méthodologie :** nous avons réalisé une étude transversale chez les patients suspects de la TB-RR/MR entre février 2019 et mars 2025 dans le laboratoire P-3 de Mycobactériologie et des Fièvres Hémorragiques du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC). Après confirmation de la TB-RR par le test Xpert® MTB/RIF, l'ADN du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) extrait a été récupéré directement à partir des cartouches pour la réalisation du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0. La méthode de susceptibilité phénotypique 2^{ème} ligne de BD/BACTEC/MGIT a été utilisée comme test de référence. **Résultats :** vingt-huit (28) cartouches de 28 patients différents ont été utilisées. Le sex-ratio des patients était de 2,5 et la co-infection TB/VIH était de 35,71%. Les fréquences de la TB-Pré-ultrarésistante (Pre-UR) et TB-UR ont été respectivement de 3/28 et 1/28. La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positive et négative du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 ont été respectivement de 100%, 87,50%, 100% et 57,14%. Les mutations ont été observées au niveau des gènes *gyrA* pour les fluoroquinolones et *rrs* pour les aminoglycosides. **Conclusion :** plus rapide et facile à réaliser, le test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 a montré une bonne performance dans la détection des résistances aux fluoroquinolones que les aminoglycosides. Un échantillonnage beaucoup plus large est nécessaire pour confirmer ces tendances afin de vite détecter la circulation des souches de TB-PR.

Mots-clés : cartouche Xpert/MTB ; Mali ; MTBDRsl VER 2.0 ; TB-PR

Abstract

Introduction: Rapid diagnosis of rifampicin-resistant tuberculosis (RR-TB) or multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), followed by initiation of second-line anti-tuberculosis treatment, remains crucial in the fight against drug-resistant tuberculosis (DR-TB). The objective of this work was to evaluate the diagnostic performance of the GenoType® MTBDRsl VER 2.0 test in the detection of TB-PR in Bamako, Mali from the DNA extract recovered from the Xpert® MTB/RIF cartridge compared to the reference method. **Methodology:** We conducted a cross-sectional study of patients suspected of having RRTB/MDRTB between February 2019 and March 2025 in the Mycobacteriology and Hemorrhagic Fever Laboratory of the University Clinical Research Center (UCRC). After confirmation of TB-RR by the Xpert® MTB/RIF test, mycobacterial DNA was extracted directly from the cartridges for the GenoType® MTBDRsl VER 2.0 test. The BD/BACTEC/MGIT phenotypic susceptibility method was used as the reference test. **Results:** Twenty-eight (28) cartridges from 28 different patients were used. The sex ratio of patients was 2.5, and the frequency of TB/HIV coinfection was 35.71%. The frequencies of pre extensively drug-resistant TB (Pre-XDR-TB) and XDR-TB were 10.71% and 3.57%, respectively. The sensitivity, specificity, positive predictive, and negative predictive values of the GenoType® MTBDRsl VER 2.0 test in detecting resistance to second-line drugs were 100%, 87.5%, 100%, and 57.14%, respectively. Mutations were observed in *gyrA* gene for Fluoroquinolones and *rrs* gene for aminoglycosides. **Conclusion:** Faster and easier to perform, the GenoType® MTBDRsl VER 2.0 demonstrated a relatively good performance in detecting resistance to fluoroquinolones than aminoglycosides. A much larger sample size is needed to confirm these trends to allow rapid detection of circulating DR-TB strains.

Keywords: Xpert/MTB cartridges ; Mali ; MTBDRsl VER 2.0 ; DR-TB.

INTRODUCTION

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse, contagieuse provoquée par les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) [1]. A l'échelle mondiale, la TB est l'une des dix (10) principales causes de décès et la première cause de décès due à un agent infectieux unique devant le VIH/SIDA [1]. Selon le rapport mondial de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur la tuberculose de 2024, on estime qu'il y a eu 10,6 millions de cas de tuberculose et 1,3 million de décès en 2023, avec un taux d'incidence de 133 pour 100 000, dont 161 000 personnes vivant avec le VIH (PVVIH) [1]. Pendant la même année, la fréquence de la tuberculose multirésistante (TB-MR) a été de 3,3 % parmi les nouveaux patients et de 17,7 % chez les patients précédemment traités [1]. Ces patients atteints de TB-MR peuvent également développer une autre forme de résistance pouvant conduire à la tuberculose pré-ultra-résistante (TB-pré-UR) voire ultra-résistante (TB-UR) [2]. La TB-UR est une forme de TB causée par une souche du CMT résistante à la rifampicine (et parfois également à l'isoniazide), et qui est aussi résistante à au moins une fluoroquinolone (la lévofloxacine ou la moxifloxacine) et à au moins un autre antibiotique du groupe A (la bédaciline ou le linézolide), ou précédemment et à au moins une molécule injectable d'aminosides (amikacine, kanamycine, capréomycine) [1].

À l'échelle mondiale, en 2023, la proportion estimée de cas de tuberculose TB-RR/MR présentant une pré-XDR-TB (c'est-à-dire au moins une résistance à une fluoroquinolone, à un aminoside ou à un médicament du groupe A) était de 19 % (IC à 95 % : 17-21 %) [1].

C'est ainsi que l'OMS et plusieurs programmes nationaux ont recommandé que si le test Xpert® MTB/RIF de GeneXpert® détecte une résistance à la rifampicine (TB-RR), qu'un crachat supplémentaire soit collecté pour d'autres tests de susceptibilité aux antituberculeux (TSA) à l'aide du test d'hybridation inversée (*line probe assay en anglais*) (LPA), tels que MTBDR *plus* (RIF et INH) et MTBDR *sl* VER 2.0 (FQ et SLID), ou des tests phénotypiques afin d'éliminer rapidement une TB-UR [1].

Au Mali, selon le rapport annuel 2024 de la Cellule Sectorielle de Lutte Contre le VIH/SIDA, la Tuberculose et les Hépatites Virales (CSLS-TBH), le nombre de cas de TB-RR variait de 19 en 2022 à 37 en 2024, avec un

pic en 2024 [5]. Le Mali avait diagnostiqué ses deux premiers cas de TB-UR identifiés parmi les patients TB-MR en 2017 [4]. Encore en 2021, et 2024 des patients atteints de la TB-pré-UR et TB-UR ont été identifiés et sont actuellement sous traitement [5].

Contrairement aux méthodes phénotypiques qui sont longues et nécessitent plus d'infrastructures et de personnels qualifiés, les méthodes moléculaires de TSA de 1^{ère} et 2^{ème} ligne, bien qu'elles nécessitent également un personnel qualifié ; elles sont rapides, précises et actuellement disponibles [6]. Ainsi, ces nouvelles méthodes moléculaires, telles que le test Xpert® MTB/RIF de GeneXpert®, et le Line Probe Assay (MTBDRsl VER 2.0) déterminent la présence des mutations spécifiques associées à la résistance aux antituberculeux de 1^{ère} et 2^{ème} ligne [6]. Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones impliquent les gènes *gyrA* et *gyrB* et celles des aminosides couvrent à la fois les gènes *rrs* et *eis* [7]. L'objectif de notre travail était de mettre en place de cette technique de récupération d'extrait d'ADN des mycobactéries à partir de la cartouche utilisée du test Xpert® MTB/RIF et d'évaluer la performance diagnostique du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 dans la détection de la TB-pré-UR et TB-UR à Bamako, Mali. Ainsi cela nous permettra de réaliser de façon spontanée ce test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 devant tout cas de TB-RR/MR comme recommandé par l'OMS et ses partenaires [7].

MATÉRIELS ET MÉTHODE

❖ Type et période d'étude

Il s'est agi d'une étude transversale qui s'est déroulée entre février 2019 et mars 2025

❖ Cadre d'étude

L'étude a été réalisée au laboratoire P-3 de Mycobactériologie et des fièvres hémorragiques du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC), de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB).. Le Programme UCRC, est une initiative de recherche biomédicale qui a débuté en 2003. Il s'agit d'une collaboration entre les instituts nationaux de la santé des Etats Unis d'Amérique (NIH-NIAID) et l'Université de Bamako, Mali et est logé au sein de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH). Le laboratoire est certifié par le College of American Pathologists (CAP) dans le cadre du

contrôle de qualité externe comme précédemment décrits [8, 9].

❖ Population d'étude

La population d'étude était constituée par les patients tuberculeux sous traitement qui se sont présentés au centre de diagnostic et de traitement (CDT) de la tuberculose d'un des six Centre de Santé de Référence (CS Réf) ou au CHU du Point-G avec résultat de TB-RR par le test Xpert®MTB/RIF de GeneXpert®. Ces sites sont les CDT de la ville de Bamako disposant des machines de GeneXpert et spécialisés dans le diagnostic et la prise en charge de la TB-RR.

La population cible concernant les patients avec TB-RR identifiés dans les CDT et qui acceptaient volontiers de participer à l'étude.

Déroulement de l'étude : une fois identifié comme TB-RR dans un CDT, les patients étaient approchés par le personnel de l'étude pour des explications et ceux/celles qui voulaient participer ont signé un consentement libre et éclairé avant de rentrer.

Collecte des échantillons : en plus des informations socio-démographiques, les patients devaient fournir au moins un échantillon de crachat de 5ml environ pour confirmation, et une fois le test de Xpert MTB/RIF avec résultat positif de TB-RR connu, les cartouches usagées étaient conservées dans les réfrigérateurs entre 4 et 8°C avant la récupération d'extraits d'ADN dans les 5 jours au plus. C'était une étude avec échantillonnage exhaustif sur cinq ans.

❖ Analyse au laboratoire

Les échantillons de crachats collectés auprès des patients ont bénéficié d'un examen microscopique, de la culture sur un milieu liquide (bouillon 7H9) à partir de l'automate BACTEC/MGIT/960. L'identification a été réalisée par Capilia™ TB Neo test ainsi que les TSA aux antibiotiques de 2ème ligne et le typage des sous types des mycobactéries du CMT dans le laboratoire P3.

Test Xpert® MTB/RIF

Les tests Xpert MTB/RIF ont été effectués dans les CDT, et repris au laboratoire UCRC pour confirmation. Les cartouches étaient conservées à UCRC avant la récupération d'extraits d'ADN dans les 5 jours au plus dans le laboratoire P3.

Récupération de l'ADN génomique mycobactérien à partir des cartouches Xpert® MTB/RIF

Comme illustré sur la figure 1, l'ADN des cartouches usagées du test Xpert®MTB/RIF

chez les patients confirmés TB-RR a été récupéré filment à l'aide d'une seringue à insuline, les extraits ont été distribués dans les tubes à PCR. Tout le personnel du laboratoire P3 au point-g a été formé et aucun incident n'a été observé durant les procédures. La chambre de réaction transparente en forme de losange à l'arrière de la cartouche a été perforée avec une seringue stérile à aiguille fixe (1 ml ; 25 G) (Figure 1 A) sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe 2 comme précédemment décrit [7]. Le volume d'ADN contenant dans la cartouche d'environ 15 µl, a été prélevé et stocké dans des tubes PCR (Figure 1 B) stérile avant l'analyse. Chaque cartouche et la surface environnante ont été soigneusement essuyées avec d'Alcool isopropylique à 70 % à usage unique avant et après la récupération de l'ADN et une stérilisation aux UV était effectuée après chaque séance. Les aiguilles usagées ont été jetées dans une boîte de sécurité. Avant et après chaque session de récupération de l'ADN de la cartouche, la surface de la hotte a été décontaminée avec un détergent vesphene II® STERIS. Après récupération de l'ADN, le Nanodrop (thermo Scientific NanoDrop Products longueur d'onde (260-280) a été utilisé pour vérifier le matériel génétique (pureté de l'ADN) et les échantillons d'extraits d'ADN ont été ensuite conservés à -20 °C avant analyse par le test MTBDRsl VER 2.0.

Test de susceptibilité génotypique aux antituberculeux de 2ème ligne par GenoType® MTBDRsl VER 2.0

Ce test est résumé en trois étapes : l'extraction de l'ADN, l'amplification de l'ADN, et l'hybridation conformément aux instructions du fabricant [11].

Ainsi pour l'extraction de l'ADN : c'était l'ADN récupéré des cartouches usagées du test Xpert®MTB/RIF dont la pureté avait été vérifiée par le Nanodrop et qui a été utilisé pour le test. Pour l'amplification de l'ADN, après préparation du mixte incluant tous les réactifs nécessaires au test, on distribuait 45µl de mixte plus 5µl de l'ADN extrait dans chaque tube PCR. Le programme de l'amplification incluait 52 cycles de PCR conformément aux instructions du fabricant répartis comme suit : 1 cycle (15 mn : 95°C), 20 cycles (30 sec/2 mn : 95°C/65°C), 30 cycles (25 sec/40 sec/40 sec : 95°C/50°C/70°C), et 1 cycle (8 mn : 70°C). Quant à l'hybridation, 20µl du produit amplifié pour chaque patient était mélangé avec les réactifs pour sa réalisation. Ainsi après une

série de lavage, les résultats étaient interprétés pour apprécier l'absence ou la présence de mutation sur les bandelettes et identifier les résistances ou non.

Test de susceptibilité Phénotypique aux antituberculeux de 2^{ème} ligne par BACTEC MGIT 960

Des cultures pures de jeunes colonies (14 jours au maximum) pour chaque patient ont été prélevées sur des milieux de culture solide (Middlebrook 7H11) et utilisées pour réaliser ce test phénotypique avec le système MGIT 960. A l'aide d'une anse stérile à usage unique, nous avons mis en suspension des colonies prélevées sur le milieu 7H11 Middlebrook et chaque suspension a été ajustée à 0.5 McFarland à l'aide d'un turbidimètre. Une fois ajusté, 1 mL de cette solution a été transféré dans les tubes qui ont été bien homogénéisés et inoculés dans les tubes MGIT contenant les différents antituberculeux conformément aux instructions du fabricant. Les antibiotiques utilisés pour ces tests et leur concentrations critiques ont été : Kanamycine (5 µg/mL), Amikacine (1,0 µg/mL), Capréomycine (2,5 µg/mL), Ciprofloxacine (1,0 µg/mL), Ofloxacine (2,0 µg/mL) ; Moxifloxacine (0,25 µg/mL) ; Éthionamide (5 µg/mL), Prothionamide (2,5 µg/mL) ; Acide 4-aminosalicylique (4,0 µg/mL) et Linézolide (1,0 µg/mL). La proportion de 1 % est assurée par l'inoculation des tubes témoins de croissance sans antibiotiques avec les inoculums dilués à 1:100. L'instrument BACTEC MGIT 960 était programmé pour interpréter les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques (TSA) selon un ordre précis. L'appareil analyse d'abord le tube témoin (sans antibiotique) de croissance. Lorsque la densité de la culture du tube témoin atteint 400 unités de croissance, les tubes contenant les antibiotiques sont évalués. L'ordre des antibiotiques dans les supports doit toujours être identique si le même ensemble d'antibiotique est utilisé pour les tests.

❖ Analyse Statistique

En plus des variables épidémiocliniques et biologiques (âge, sexe, type de résistance, statut VIH obtenues auprès des patients lors des visites), les valeurs moyennes des sensibilités, spécificités, valeur prédictive positive (VPP) et valeur prédictive négative (VPN) ainsi que leur intervalle de confiance (IC) à 95 % de la technique GenoType® MTBDRsl VER 2.0 par rapport au test de susceptibilité phénotypique des médicaments de 2^{ème} ligne qui a été considéré comme la référence. Les tableaux de

contingence ont été générés en considérant le test de susceptibilité phénotypique comme test de référence. Ces tableaux ont été saisis dans le logiciel Open Epi version 3.01 et Epi Info 2025, version : 7.2.5.0 CDC, Atlanta, Georgia-US pour obtenir les estimations avec leurs intervalles de confiance. Les formules suivantes sont utilisées par le logiciel :

Le Sensibilité = Nombre de vrais positifs sur le total des positifs obtenus par le test de référence.

La VPP = Nombre de vrais positifs sur le total des tests positifs obtenus par la technique GenoType® MTBDRsl VER 2.0.

La Spécificité = Nombre de vrais négatifs sur le total des négatifs obtenus par le test de référence.

La VPN = Nombre de vrais négatifs sur le total des tests négatifs obtenus par la technique GenoType® MTBDRsl VER 2.0.

❖ Aspects Ethiques

Le protocole de recherche avait reçu l'approbation des comités d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontostomatologie (FMPOS) (actuel FMOS/FAPH) et celui des instituts nationaux de la santé aux Etats Unis d'Amérique (NIH-NIAID), Bethesda, USA (No 05-1-N038 FMOS/USTTB). La confidentialité a été respectée par l'anonymisation des échantillons et l'archivage des dossiers dans une armoire fermée à clé limitant l'accès aux personnels non autorisés.

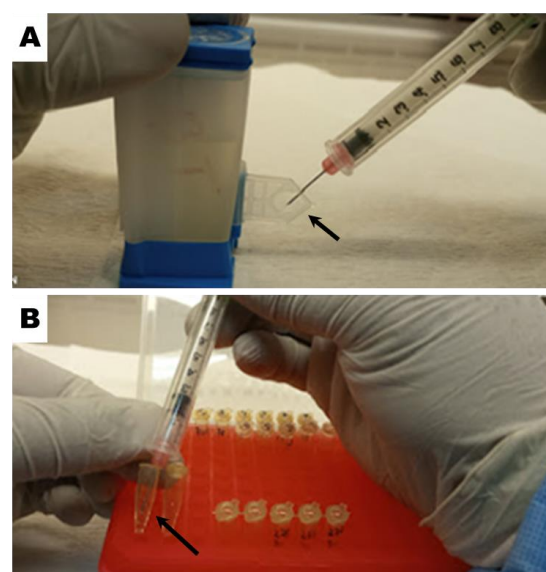


Figure 1 : procédure de récupération de l'extrait d'ADN de la cartouche de GeneXpert et distribution dans les tubes à PCR. La flèche (A) indiquée la perforation de la seringue à la chambre de réaction en forme de losange et contient de l'ADN génomique mycobactérien. (B) Distribution de l'ADN dans un tube à PCR.

RÉSULTATS

❖ Caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients

Vingt-huit cartouches avec résultats de TB-RR de 28 patients différents ont été incluses dans cette étude. Le sex-ratio des patients était de 2,5 et la fréquence de la co-infection TB/VIH était de 35,71%. La grande majorité des patients soit 60,71 % provenait des cas de retraitement. Le nombre des patients, les âges, et sexes sont présentés dans le tableau I.

❖ Détection des mutations associées à la résistance aux antibiotiques de 2^{ème} ligne et fréquence de la tuberculose ultra-résistante avec le test MTBDRsl VER 2.0.

Parmi les échantillons testés, nous avons obtenu des mutations au niveau de deux gènes : *gyrA*, (MUT2, MUT3B+MUT3C) ; et *rrs* (MUT1), comme illustré dans le tableau II. Avec ces mutations conférant des résistances aux antibiotiques de 2^{ème} ligne, la fréquence de la TB-UR était de 1/28 et celle de la TB-pré-UR de 3/28 patients.

❖ Performances du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0

En comparaison à la méthode phénotypique qui n'avait identifié qu'un (1) seul cas de TB-UR et six (6) cas de TB-pré-UR, le test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 a identifié un seul cas de TB-UR, contre trois (3) cas de TB-pré-UR. Ainsi la sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 dans la détection des résistances aux antibiotiques de 2^{ème} ligne ont été respectivement de 100%, 87,50%, 100% et 57,14%. Et plus spécifiquement, ces valeurs étaient de (100 % [IC à 95 %, 43,85 à 100 %], 100% [IC à 95 %, 86,66 à 100 %]), (100 % [IC à 95 %, 43,85 à 100 %] et 100% [IC à 95 %, 86,66 à 100 %]) dans la détection des résistances aux fluoroquinolones et de (25 % [IC à 95 % 4,559 à 69,94 %], 87,5 % [IC à 95 % 69–95,66 %], (25 % [IC à 95 % 4,559 à 69,94 %] et 87,5 % [IC à 95 % 69–95,66 %] dans la détection des résistances aux aminosides comme illustré dans le tableau III.

Tableau I : caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients de l'étude.

Catégories	Effectif (N=28)	%
Age		
20-24	6	21,43%
25-34	14	50%
35-44	5	17,86%
45≥	3	10,71%
Sexes		
Masculin	20	71,43%
Féminin	8	28,57%
Statut VIH		
Négatif	18	64,29%
Positif	10	35,71%
Xpert MTB+ /RIF+		
Niveau de détection élevé	15	53,58%
Niveau de détection moyen	10	35,71%
Niveau de détection faible	3	10,71%
Type de patient		
Nouveaux cas	11	39,29%
Retraitements	17	60,71 %

VIH= Virus de l'Immunodéficience Humaine, MTB= Mycobacterium tuberculosis, RIF=Rifampicine

Tableau II : profil des différentes mutations des gènes observées lors du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0

Antibiotiques	Susceptibilité	Gènes	Probe Associés Résistant		Mutation détectée
			WT probe	MUT Probe	
FLQ	Résistant (n=3)	<i>gyrA</i>	ΔWT2	MUT2	S91P
			ΔWT3	MUT3C	D94G
			ΔWT3	MUT3B+MUT3C	D94N/D94Y+D94G
	Sensible (n=25)		WT	-	Pas de Mutation détectée
AMG	Résistant (n=1)	<i>rrs</i>	ΔWT1	<i>rrs Mut1</i>	A1401G
	Sensible (n=27)		WT	-	Pas de Mutation détectée

FLQ : fluoroquinolone ; AMG : aminoglycosides ; *gyrA*= gyrase, MUT= mutation, *rrs*= mutation associée aux aminosides,

Tableau III : comparaison du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 dans la détection des mutations de résistance par rapport au test phénotypique des Fluoroquinolones et des Aminosides

		Test GenoType® MTBDRsl/ VER 2.0		
		Resistant	Sensible	Total
Test de susceptibilité phénotypique des antibiotiques de 2^{ème} ligne : fluoroquinolones	Resistant	3	0	3
	Sensible	0	25	25
Total		3	25	28
		Resistant	Sensible	Total
Test de susceptibilité phénotypique des antibiotiques de 2^{ème} ligne : aminosides	Resistant	1	3	4
	Sensible	3	21	24
Total		4	24	28

Trois (3) patients étaient résistants aux fluoroquinolones et un (1) seul cas de résistance aux aminosides à l'aide du test GenoType® MTBDRsl VER 2.0 par rapport au test phénotypique.

DISCUSSION

Nous avons évalué la performance diagnostique du test GenoType® MTBDRsl/ VER 2.0 à partir de l'ADN extrait de la cartouche de GeneXpert® MTB/RIF comparativement au test de référence phénotypique comme recommandé par l'OMS et ses partenaires depuis mai 2016 [15,16]. La technique de récupération d'extrait d'ADN à partir de la cartouche Xpert® MTB/RIF que nous avons utilisée a montré une amélioration de la sensibilité et de la spécificité pour la détermination de la résistance moléculaire aux FLQ et aux aminoglycosides par rapport au test phénotypique. Les résultats obtenus étaient similaires à ceux rapportés par Gardee Y et *al.* en 2017 en Afrique du Sud qui avaient trouvé des indices de sensibilité de 100% pour les FLQ et entre 86,2 et 93,8% pour les aminoglycosides [16]. Ces résultats confirment la plus grande sensibilité du GenoType MTBDRsl/ VER 2.0 pour les FLQ que les aminoglycosides. Ces techniques moléculaires rapides et plus "sûres" constitueraient des avancées plus importantes dans la détection rapide de la TB-PR. Les méthodes phénotypiques bien vrai qu'elles soient les méthodes de références sont longues, fastidieuses et difficiles à mettre en place surtout dans le contexte de pays à revenu faible ou intermédiaire puisqu'il faut des laboratoires de niveau de sécurité élevé, un personnel qualifié [10, 13-14].

Nous avons trouvé que parmi les patients tuberculeux, les hommes étaient plus touchés (71,43%) que les femmes (28,57%). Ces résultats étaient similaires à ceux du rapport annuel 2024 de la CSLS-TBH du Mali et celui de Dabitao et *al.* en 2022 [17]. En outre, la prévalence élevée de la tuberculose chez les hommes a été signalée dans presque toutes les régions du monde [18, 19]. Aussi, la tranche

d'âge majoritaire de 25-34 en faveur des hommes était comparable aux résultats de l'étude Baya et *al.* en 2023 [20] démontrant encore le fardeau économique que constitue la TB et la TB-PR (fréquence élevée chez les hommes et aussi la tranche d'âge adulte économiquement productive).

Les fréquences des cas de TB-pré-UR et TB-UR dans cette population sélectionnée de TB-RR/MR ont été respectivement de 3/28 et de 1/28 soulignant une fréquence relativement faible de TB-PR au Mali comme signalé dans les précédentes études [4, 29], mais avec une fréquence élevée de co-infection par le VIH comme précédemment annoncée [4, 5, 29].

Les mutations conférant les résistances aux FLQ et aux aminoglycosides dans l'identification des patients TB-UR et TB-pré-UR ont été les mêmes que celles observées lors des précédents patients TB-UR au Mali. En effet les mutations ont été observées au niveau des gènes *gyrA* et *rrs* et non pas sur les *gyrB* et *ies* comme précédemment rapporté en 2017 par notre équipe lors de la première identification de la TB-UR [4]. En effet, cette même fréquence des gènes chez les patients TB-UR pourrait être du soit probablement à une endémicité de ces gènes à Bamako, au Mali ou signifier une transmission de ces gènes de résistance parmi les patients tuberculeux et/ou TB-PR.

En plus, la résistance aux FLQ était principalement due aux mutations du gène *gyrA* aux codons 94 et 90, et rarement aux codons 88 et 91 [21]. Comme démontré dans des études précédentes, le taux de détection des mutations variait entre 57,5% pour le codon 94 et 25,5 % pour le codon 90 ce qui est différent à ceux trouvés dans la présente étude pour le codon 94 (10,7, %) et le codon 91 (3,6 %). Cette différence pourrait s'expliquer probablement

par la taille de l'échantillon relativement très petite comparée aux études précédentes. Les mutations les plus courantes étaient à D94G dans le gène *gyrA*, représentant 10,7 % de toutes les mutations, suivies des mutations à S91P (25,5 %), qui ont également été observées dans cette étude. Cette fréquence élevée de la résistance aux FLQ pourrait s'expliquer par le fait qu'elles sont beaucoup plus utilisées (utilisation par voie orale et aussi dans beaucoup d'autres maladies bactériennes) contrairement aux aminosides qui sont les moins utilisées (uniquement par injection). Nous n'avons pas eu de mutations au niveau du gène *gyrB* comme pour Maningi et. al, qui n'avaient pas également observé de mutation au niveau de ce gène *gyrB* en Afrique du Sud [22]. Par conséquent, nous pouvons dire que les mutations au niveau du *gyrA* étaient les principales causes de résistance aux FLQ.

Pour les résistances aux aminoglycosides, des études antérieures avaient démontré que la mutation A1401G du gène *rrs* était la plus courante et pouvait être attribuée à un niveau élevé de résistance à la kanamycine (KAN) et à la résistance croisée à l'amikacine (AMK) et à la capréomycine (CAP) [23, 24]. Dans notre étude, nous avons trouvé 3,6% des mutations du gène *rrs* MUT1 à A1401G pour la résistance aux aminoglycosides. Aussi d'autres études ont montré que la plupart des résistances aux aminoglycosides étaient observés au niveau de la mutation A1401G [25, 26].

Un autre résultat important de cette étude est la forte fréquence de la TB-RR observée parmi les cas d'échec thérapeutique/de retraitement. Une solution à ce problème serait d'améliorer l'accès des patients aux médicaments appropriés et de réduire le temps et le coût associés aux déplacements vers les centres de référence pour le traitement. Bien que notre étude se soit limitée à la région du district de Bamako, le service de Pneumo-Phtisiologie du CHU du Point G est la structure de référence de prise en charge de la TB-PR au Mali, et nous n'avons donc pas pu contrôler l'inclusion de souches provenant de régions autres que Bamako.

Cette étude est limitée par le nombre relativement petit de patients TB-RR inclus, mais aussi ceux du district de Bamako. Un échantillonnage beaucoup plus élargi à d'autres régions pourrait non seulement confirmer cette bonne tendance mais aussi permettrait une meilleure évaluation de la technique. Malgré ces limites, notre approche par l'utilisation du génotype MTBDR sl VER 2.0 constitue une

étape logique d'identification des différentes mutations et leur transmission dans la région et améliorer la prise en charge des patients TB-PR, mais aussi faciliter la compréhension de la propagation de la maladie au Mali et en Afrique de l'Ouest.

CONCLUSION

La réalisation du test GenoType® MTBDRsl/ VER 2.0 a montré de très bons résultats dans la détection de la résistance aux Fluoroquinolones mais une sensibilité faible dans la détection des résistances aux aminosides. Ces résultats supportent l'hypothèse que la récupération de l'ADN suivie de la réalisation du test GenoType® MTBDRsl/ VER 2.0 pourraient contribuer dans la détection rapide de la TB-UR et Pré-UR chez les patients confirmés TB-MR.

Remerciements : au terme de cette étude, nous remercions les personnels des laboratoires UCRC, les personnels des unités TB des Centres de Santé de Référence du district de Bamako (Cs Réf), les personnels des services de Pneumo-phtisiologie et des maladies infectieuses et tropicales du Centre Hospitalier Universitaire du Point << G >>, et les personnels du laboratoire national de référence des mycobactéries (LNR) pour leur assistance dans l'identification et le recrutement des patients TB-MR. En plus, nous remercions le projet *WARM Based* de DCR-CCRB/NIH pour leur soutien dans l'acquisition et l'entretien de l'équipement GenoType® MTBDRsl/ VER 2.0.

Appui financier : cette étude a reçu un appui financier de la part du Grant D43 TB/HIV du numéro D43TW010350.

RÉFÉRENCES

1. World Health Organization: Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational 'How-to'; practical considerations. WHO/HTM/TB/2011.2.
2. Sharma R, Sharma SK, Singh BK, Mittal A, Kumar P. High degree of fluoroquinolone resistance among pulmonary tuberculosis patients in New Delhi, India. *Indian J Med Res.* 2019;149(1):62-63.
3. Association of Public Health Laboratories. TB drug susceptibility testing. Expert panel meeting: summary report. December 12–13, 2007. Atlanta, GA, USA: APHL, 2007. <http://www.aphl.org/aphlprograms/infectio>

- us/tuberculosis/Documents/TB_DST_Report.pdf Accessed February 2012.
4. Diarra, B., Toloba, Y., Konate, B., et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in Mali: a case report. *BMC research notes*. 2017; 10(1), 561. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2890-4>.
 5. Ministère de la Santé et du Développement Social. Rapport Annuel 2024 de la cellule sectorielle de lutte contre la tuberculose et les hépatites virales (CSLS-TBH).
 6. Cirillo DM, Miotto P, Tortoli E. Evolution of Phenotypic and Molecular Drug Susceptibility Testing. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1019 :221-46.
 7. Venter R, Derendinger B, de Vos M, et al. Mycobacterial genomic DNA from used Xpert MTB/RIF cartridges can be utilised for accurate second-line genotypic drug susceptibility testing and spoligotyping. *Sci Rep*. 2017 ;7(1) :14854.
 8. Togo ACG, Kodio O, Diarra B, et al. The most frequent Mycobacterium tuberculosis complex families in mali (2006-2016) based on spoligotyping. *Int J Mycobacteriol*. 2017 ;6(4):379-386. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_140_17. PMID: 29171452; PMCID: PMC5759756.
 9. Diarra B, Siddiqui S, Sogoba D, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing strain, Bamako, Mali. *Emerg Infect Dis*. 2010 ;16(2):362-3. doi: 10.3201/eid1602.090501. PMID: 20113590; PMCID: PMC2957995.
 10. World Health Organization. Xpert Rollout Status (2016). accessed at: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/laboratory/mtb-rif-rollout/en/>, 2017.
 11. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. 2020 [cité 18 avr 2021] ; Disponible <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>.
 12. Giannoni F, Iona E, Sementilli F, et al. Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of gyrA mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul; 49(7) :2928-33.
 13. World Health Organization. (2016). Rapid diagnostic test and shorter, cheaper treatment signal new hope for multi-drug-resistant tuberculosis patients. Geneva : World Health Organization ; 2016.
 14. Gardee Y, Dreyer AW, Koornhof HJ, et al. Evaluation of the GenoType MTBDRsl Version 2.0 Assay for Second-Line Drug Resistance Detection of Mycobacterium tuberculosis Isolates in South Africa. *J Clin Microbiol*. 2017 ;55(3):791-800. doi: 10.1128/JCM.01865-16. Epub 2016 Dec 14. PMID: 27974543; PMCID: PMC5328447.
 15. Hain Lifescience. GenoType MTBDRsl VER 2.0 Instructions for Use (2015).
 16. World Health Organization: Rapid diagnostic test and shorter cheaper treatment signal new hope for multidrug-resistant tuberculosis patients, WHO: <https://www.who.int/fr/news/item/May-2016>.
 17. Dabita D, Somboro A, Sanogo I, et al. Sex Differences in Active Pulmonary Tuberculosis Outcomes in Mali, West Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2022 ;107(2):433-440. doi: 10.4269/ajtmh.21-1141. PMID: 35895582; PMCID: PMC9393465.
 18. Nhamoyebonde S, Leslie A. Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*. 2014 ;209 Suppl 3:S100-6. doi: 10.1093/infdis/jiu147. PMID: 24966189.
 19. Neyrolles O, Quintana-Murci L. Sexual inequality in tuberculosis. *PLoS Med*. 2009 ;6(12):e1000199. doi: 10.1371/journal.pmed.1000199. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20027210; PMCID: PMC2788129.
 20. Baya B, Sanogo I, Kone M, et al. Relationship between patient sex and anatomical sites of extrapulmonary tuberculosis in Mali. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2023;33:100389. doi: 10.1016/j.jctube.2023.100389. PMID: 37637324; PMCID: PMC10448223.
 21. Aubry A, Veziris N, Cambau E, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Fisher LM. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 ;50(1):104-12. doi: 10.1128/AAC.50.1.104-112.2006. PMID: 16377674; PMCID: PMC1346799.
 22. Maningi NE, Malinga LA, Antiabong JF, Lekalakala RM, Mbelle NM. Comparison of line probe assay to BACTEC MGIT 960 system for susceptibility testing of first and second-line anti-tuberculosis drugs in a referral laboratory in South Africa. *BMC Infect Dis*. 2017 ;17.
 23. Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC.

- Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(3):e33275. doi: 10.1371/journal.pone.0033275. Epub 2012; PMID: 22479378; PMCID: PMC3315572.
24. Hu Y, Hoffner S, Wu L, Zhao Q, Jiang W, Xu B. Prevalence and genetic characterization of second-line drug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rural China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Aug;57(8):3857-63. doi: 10.1128/AAC.00102-13. Epub 2013; PMID: 23733477; PMCID: PMC3719720.
25. Ajbani K, Nikam C, Kazi M, et al. Evaluation of genotype MTBDRsl assay to detect drug resistance associated with fluoroquinolones, aminoglycosides and ethambutol on clinical sediments. *PLoS One*. 2012;7(11):e49433. doi: 10.1371/journal.pone.0049433. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23166667; PMCID: PMC3499545.
26. Via LE, Cho SN, Hwang S, et al. Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korean Patients with drug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2010 ;48(2):402-11. doi: 10.1128/JCM.01476-09. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20032248; PMCID: PMC2815586.
27. Jian J, Yang X, Yang J, Chen L. Evaluation of the GenoType MTBDRplus and MTBDRsl for the detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* on isolates from Beijing, China. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1627-1634. doi: 10.2147/IDR.S176609. PMID: 30319279; PMCID: PMC6171507.
28. Sethi S, Agarwal P, Khaneja R, et al. Second-line Drug Resistance Characterization in *Mycobacterium tuberculosis* by Genotype MTBDRsl Assay. *J Epidemiol Glob Health*. 2020; 10(1):42-5.
29. B Diarra, D Goita, S Tounkara, et al. Tuberculosis drug resistance in Bamako, Mali, from 2006 to 2014. *BMC Infect Dis*. 2016 ;16(1):714. PMID: 27894266 DOI: 10.1186/s12879-016-2060-7.