

Amélioration du diagnostic de la tuberculose par le Mycobacteria Growth Indicator tube (MGIT) dans un laboratoire de pays en développement.

E. A. Macondo (1, 2), F. Ba (3), N. C. Toure-Kane (1), O. Kaire (1),
A. Gueye-Ndiaye (1), A. Gaye-Diallo (1), C. S. Boye (1) & S. Mboup (1)*

(1) Laboratoire de bactériologie-virologie, CHU A.Le Dantec, Dakar, Sénégal.

(2) BIO-24.Laboratoire d'analyses de biologie médicale, CHU A.Le Dantec, Dakar, Sénégal.

(3) Programme national de lutte contre la tuberculose (PNT) du Sénégal.

* Correspondant : Pr. S. Mboup, Laboratoire de bactériologie-virologie; Faculté de médecine et de pharmacie, Université Cheikh Anta Diop, BP 7325, Dakar, Sénégal.

Tel : (221) 822-59-19/ (221) 821-64-20. Fax : (221) 821-64-42. E-mail : virus@sonatel.senet.net

Manuscrit n° 2145. "Bactériologie". Reçu le 6 janvier 2000. Accepté le 4 avril 2000.

Summary: Improvement of tuberculosis diagnosis by Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) in a developing country laboratory.

In order to improve tuberculosis diagnosis in a developing country (Senegal), we evaluated a new liquide-based medium and nonradioactive system, Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), with individual clinical specimens collected in Dakar. The main purpose was to compare the time to detection and the rate of recovery of Mycobacterium tuberculosis complex and to determine its importance with respect to LOWENSTEIN-JENSEN (LJ), a liquid-based-medium for isolation of M. tuberculosis complex.

531 specimens were processed with Mycoprep kit containing NaOH-N-acetyl L-cystein, inoculated on both LJ and MGIT and incubated at 37 °C for 60 days. For each medium, the recovery rate and the time to detection were recorded. Among the 531 specimens, of which 121 smears were positive, 32.5% (173/531) grew M. tuberculosis complex. Of these, 103 were smear positive (S+) and 70 smear negative (S-). LJ recovered 54.9% (95/173) and MGIT recovered 91.9% (159/173). Disagreements were observed with 92 isolates, LJ failed to recover 78 while MGIT failed to recover 14. The overall mean time to detection was 20.1 days for LJ and 10.5 days for MGIT.

MGIT has shown a better sensitivity in isolation with significant reduction in reporting culture for M. tuberculosis complex. As a simple and a nonradiometric system, it could be used in conjunction with egg-based media in developing countries laboratories.

Résumé :

Dans le but d'améliorer le diagnostic de la tuberculose dans un pays en développement (Sénégal), nous avons évalué un milieu liquide non radioactif, le Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), sur des échantillons cliniques avec comme objectif principal son apport à la culture en comparant le temps et le taux d'isolement du complexe Mycobacterium tuberculosis du MGIT à ceux du LOWENSTEIN-JENSEN (LJ).

Cinq cent trente et un échantillons ont été traités à l'aide du kit Mycoprep et ensemencés sur milieu de LJ et MGIT. Pour chaque milieu, le taux d'isolement et le temps de détection ont été enregistrés. Parmi les 531 échantillons ensemencés dont 121 étaient positifs à la bacilloscopie, 32,5 % (173/531) ont donné une culture positive pour le complexe M. tuberculosis. Cent trois provenaient des échantillons positifs à la bacilloscopie. De ces 173 isolats, 54,9 % (95/173) ont été isolés sur LJ et 91,9 % (159/173) l'ont été sur MGIT. Les temps d'isolement étaient de 20,1 jours sur LJ et de 10,5 jours sur MGIT.

Le MGIT a montré une bonne sensibilité et une rapidité d'isolement du complexe M. tuberculosis. Par sa simplicité et par l'absence de radioactivité dans son principe, il peut donc être utilisé à côté des milieux solides à l'œuf dans des laboratoires des pays en développement.

MGIT
LOWENSTEIN-JENSEN medium
Mycobacterium tuberculosis complex
diagnosis
laboratory
Senegal
Sub-Saharan Africa

MGIT
milieu de LOWENSTEIN-JENSEN
complexe Mycobacterium tuberculosis
diagnostic
laboratoire
Sénégal
Afrique intertropicale

Introduction

Malgré l'évidence radiologique et celle des symptômes cliniques, le diagnostic de la tuberculose nécessite une confirmation bactériologique qui se fait soit par amplifica-

tion du génome soit par la culture et l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

La bacilloscopie est la méthode la plus rapide pour le diagnostic des infections à mycobactéries, sa sensibilité est faible (50 %) et elle ne permet pas d'identifier le bacille observé (9,

16). Les méthodes d'amplification du génome permettent la détection et l'identification des mycobactéries dans un échantillon, la sensibilité de ces méthodes est inférieure à celle de la culture (3, 6, 7, 19). La culture demeure la méthode de référence, elle permet d'isoler, d'identifier et de faire des tests de sensibilité sur la souche. La sensibilité de la culture et le temps d'isolement des mycobactéries dépendent du milieu utilisé (4, 15), ceux des milieux liquides sont supérieurs à ceux des milieux solides conventionnels utilisés (9, 11).

Les études réalisées avec le Bactec 460TB radiometric system (Becton Dickinson Microbiology System Cockeysville, Md) dans les pays développés ont montré une bonne sensibilité et un temps d'isolement très réduit des mycobactéries (11, 12). Le coût (instrumentation) et la présence de la radioactivité ont limité l'utilisation de ce système dans les pays en développement.

Le Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) est un nouveau système mis au point par Becton Dickinson (Microbiology System) constitué d'un tube de 16 x 100mm contenant 4 ml du bouillon 7H9 Middlebrook modifié dont le fond est muni d'une substance fluorescente (silicone imprégné avec du ruthénium pentahydrate). Le MGIT est une méthode simple ne nécessitant pas un équipement lourd, non radioactive et d'utilisation facile. Sa sensibilité et son temps d'isolement sont identiques à ceux du Bactec 460TB comme décrites dans les études précédentes (2, 11). La croissance dans le MGIT est détectée par la fluorescence du fluorochrome lorsque les micro-organismes consomment l'oxygène dissous dans le bouillon, la croissance peut aussi être détectée par la présence d'une turbidité non homogène dans le bouillon.

Dans cette étude, nous comparons les performances (le taux d'isolement et le temps de détection) du MGIT et du milieu de LOWENSTEIN-JENSEN (LJ) pour la culture du complexe *M. tuberculosis* dans le laboratoire d'un pays en développement où le LJ est le milieu le plus utilisé et nous avons voulu savoir si l'adjonction du MGIT (milieu liquide) au LJ améliorerait de façon significative le taux d'isolement du complexe *M. tuberculosis* au Sénégal.

Matériel et méthode

Echantillons

Au total, 531 échantillons individuels, dont 495 expectorations, 11 liquides pleuraux, 8 aspirations gastriques, 5 pus et 12 autres prélèvements extra-pulmonaires, ont été collectés chez des patients suspects de tuberculose au laboratoire de bactériologie-virologie du CHU Aristide Le Dantec et dans des laboratoires périphériques de Dakar.

Traitement des échantillons et culture

Les échantillons ont été digérés et décontaminés comme l'ont décrit précédemment KENT et KUBICA (8) en utilisant le kit Mycoprep (Becton Dickinson Microbiology System) qui contient du NaOH à 2% et du N-acétyl L-cystéine à 0,5 % comme l'a recommandé le fabricant. Le culot obtenu après traitement de l'échantillon, resuspendu dans 2 ml de tampon phosphate pH 6,8 était considéré comme inoculum sur lequel un frottis était réalisé pour la bacilloscopie, dont le résultat était quantifié en 1+, 2+ et 3+ comme décrit précédemment (8, 9). Deux tubes de LJ étaient ensemencés chacun avec 0,2 ml d'inoculum, le MGIT après un enrichissement avec 0,5 ml d'un supplément contenant acide oléique, albumine, dextrose, catalase (BBL MGIT OADC), puis avec 0,1 ml d'un mélange

d'antibiotiques contenant polymyxine B, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprim et azlocilline (BBL MGIT PANTA) était ensemencé avec 0,5 ml d'inoculum. Les deux milieux étaient incubés à 37 °C pendant 60 jours. Le contrôle de qualité (CQ) était effectué sur chaque lot de MGIT avec la souche de référence ATCC 27294 comme décrit précédemment (11).

Détection de la croissance et interprétation

À partir du 3ème jour suivant l'incubation, la lecture du MGIT était faite quotidiennement en comparaison avec des tubes témoin positif (MGIT dont le contenu est remplacé par une solution de 0,4% de sulfite de sodium) et témoin négatif (un MGIT non ensemencé). La lecture du LJ était faite d'abord le 4ème jour pour vérifier les contaminations puis, après le 7ème jour, elle était faite quotidiennement et l'abondance de la culture était appréciée en 1+, 2+ et 3+ respectivement pour un nombre de colonies < 10, < 50 et > 50. Pour tous les MGIT fluorescents, une aliquote était prélevée dans le fond du tube sans agitation pour réaliser deux frottis colorés par les méthodes de ZIEHL-NEELSEN (ZN) et de GRAM. Les MGIT fluorescents dont les frottis étaient positifs au ZN étaient considérés comme MGIT positifs, ceux dont les frottis étaient négatifs au ZN étaient considérés comme MGIT négatifs (faux positifs) et ceux dont les frottis étaient négatifs au ZN et dont la coloration de GRAM montrait des bactéries étaient considérés comme MGIT contaminés. Les MGIT positifs étaient repiqués sur LJ pour une identification par des réactions biochimiques comme décrit précédemment (8,16).

L'analyse statistique était effectuée par le test de STUDENT en utilisant EpiTable (Epi Info version 6.0).

Résultats

Dans cette étude, 531 échantillons dont 121 positifs à la bacilloscopie (B+) et 410 négatifs à la bacilloscopie (B-) ont été ensemencés sur MGIT et sur LJ pour l'isolement du complexe *M. tuberculosis*. Les cultures étaient positives pour 173 échantillons (32,5 %). Parmi les 173 isolats, le taux d'isolement a été de 91,9 % (159/173) pour MGIT et de 54,9 % (95/173) pour LJ; le MGIT était plus sensible que le LJ ($p < 0,001$). L'addition du MGIT a donc amélioré le taux d'isolement de 37 %. En comparant le taux d'isolement obtenu par la combinaison des 2 milieux (MGIT/LJ) avec chaque milieu séparé, on a observé une différence statistique significative MGIT/LJ vs MGIT, $p < 0,001$ et MGIT vs LJ, $p < 0,001$.

Comme nous l'avons résumé dans le tableau I, en fonction de la bacilloscopie, 59,5 % et 40,5 % des isolats étaient respectivement B+ et B- et, dans les deux cas, le MGIT était plus sensible que le LJ, $p < 0,01$. Parmi les 121 échantillons B+, 18 n'ont pas donné une culture positive.

Le taux de contamination était plus élevé avec le MGIT : 32,3 % (172/531) que sur LJ : 11,3 % (60/531), $p < 0,0001$ et, parmi ces échantillons contaminés, 170 étaient B-. En considérant seulement les échantillons non contaminés, le taux

Tableau I.

Isolément du complexe *M. tuberculosis* dans le MGIT et sur LJ.
Isolation of M. tuberculosis complex in MGIT and on LJ.

bacilloscopie	nb (%) d'isolats			p*
	MGIT + LJ	MGIT	LJ	
bacilloscopie positive	103 (100)	98 (95,1)	66 (64,1)	< 0,0001
bacilloscopie négative	70 (100)	61 (87,1)	29 (41,4)	< 0,0001
total (%)	173 (100)	159 (91,9)	95 (54,9)	< 0,0001

* p-value MGIT vs LJ

d'isolement serait de 48,2 % (173/359) pour la combinaison MGIT/LJ.

Les discordances observées entre le MGIT et le LJ sont résumées dans le tableau II. Au total, 92 discordances ont été observées, 78 isolats sur MGIT, dont 37 B+ et 41 B- et 14 sur LJ, dont 5 B+ et 9 B-. Les 14 isolats en faveur du LJ avaient un nombre de colonies < 5 à la culture. Parmi les 42 isolats discordants B+, 37 provenaient des laboratoires périphériques.

Tableau II.

Discordances observées entre le MGIT et le LJ.
Disagreements observed between MGIT and LJ.

bacilloscopie	MGIT+/LJ-	LJ+/MGIT-
bacilloscopie 1+	7	0
bacilloscopie 2+	7	2
bacilloscopie 3+	23	3
bacilloscopie négative	41	9
total	78	14

MGIT+/LJ-: discordance en faveur du MGIT ; LJ+/MGIT-: discordance en faveur du LJ

Le temps de détection global résumé dans le tableau III était de 20,1 jours pour le LJ et de 10,5 jours pour le MGIT. Pour les échantillons B+, il était de 17,3 jours pour le LJ et de 7,8 jours pour le MGIT, celui des échantillons B- était de 21,4 jours pour le LJ et de 14,9 jours pour le MGIT. Le temps de détection des échantillons B- sur MGIT était plus réduit que celui des échantillons B+ sur LJ.

Tableau III.

Temps moyen de détection du complexe *M. tuberculosis*.
Mean time to detection of *M. tuberculosis* complex.

bacilloscopie	temps en jour (intervalle)	
	MGIT	LJ
bacilloscopie positive	7,8 (2-38)	17,3 (8-45)
bacilloscopie négative	14,9 (4-49)	21,4 (11-45)
global	10,5 (2-45)	20,1 (8-45)

Discussion

L'introduction des milieux liquides dans la culture des mycobactéries a considérablement amélioré le rendement de la culture (8, 11). Aucun milieu à lui seul ne permet d'isoler toutes les mycobactéries, il est donc conseillé de combiner un milieu liquide à un milieu solide à l'œuf et/ou gélosé pour un meilleur rendement de culture, cette combinaison est considérée comme "Gold Standard" (8, 16). Dans la plupart des laboratoires des pays africains, cette combinaison est rarement obtenue du fait du coût élevé des milieux liquides et seul un milieu solide (LJ) est utilisé pour la culture.

Parmi les 531 échantillons cultivés dans cette étude, 32,5 % (173/531) étaient positifs à la culture. De ces 173 souches, 54,9 % étaient isolées par le LJ et 91,9 % par le MGIT. Le MGIT a montré une sensibilité supérieure à celle du LJ ($p < 0,001$) et a amélioré le taux d'isolement de 37 %, des résultats identiques ont été trouvés par SATOSHI *et al.* (15). Outre l'amélioration subie par le milieu de base de MGIT (bouillon 7H9 modifié), les milieux liquides ont l'avantage, par rapport aux milieux solides, de récupérer un nombre réduit de bactéries présentes dans un échantillon et/ou de récupérer, lors d'une primoculture, les bactéries stressées par le traitement précédant la culture. Cette différence n'existe qu'au niveau de la primoculture car tous les isolats sur MGIT sont repartis après un repiquage sur LJ. Malgré la différence statistique significative entre le LJ et le MGIT, la combinaison de ces deux milieux est nécessaire pour l'obtention d'un meilleur rendement. En ce qui concerne la culture du complexe *M. tuberculosis*, PFYFFER *et al.* (11) ont montré que la combinaison de deux milieux liquides n'améliore pas le rende-

ment de culture de façon significative, comparée à la combinaison milieu liquide-milieu solide. En terme de coût-efficacité, il ne serait donc pas bénéfique d'envisager l'utilisation de deux milieux liquides à la place de la combinaison milieu solide-milieu liquide, car des études (1, 17) ont montré l'importance de l'utilisation des milieux solides dans un laboratoire de mycobactéries. D'autres études (2, 10, 12, 14) n'ont pas montré une différence significative dans l'isolement du complexe *M. tuberculosis* entre le MGIT et les milieux solides. Cette différence non significative observée dans ces études était probablement liée à un nombre réduit d'isolats du complexe *M. tuberculosis*.

Dans cette étude, deux faits ont été observés avec les isolats discordants :

- 37/42 isolats B+ proviennent des laboratoires périphériques où les prélèvements étaient conservés dans des conditions stressantes. Le MGIT a récupéré 32 et le LJ 5, ce qui montre une capacité de récupération nettement supérieure du MGIT ;
- tous les isolats discordants en faveur du LJ avaient un nombre de colonies < 5 à la culture ; ceci peut être expliqué par le fait que le seuil de détection du LJ est d'une unité formant colonie (UFC) dans l'inoculum ensemencé, tandis que, dans le MGIT, il est constitué d'une unité consommant l'oxygène dissous par unité de temps (< 60 jours).

Sur le plan du diagnostic, le MGIT a montré une bonne sensibilité en isolant 23,7 % des souches à partir d'échantillons B-, qui ont donc échappé au diagnostic par bacilloscopie et par culture sur LJ.

Le problème majeur rencontré dans cette étude était le taux de contamination élevé qui était de 32,3 %. Trois raisons principales peuvent être à l'origine de ce taux élevé de contamination :

- plus de 60 % des échantillons contaminés provenaient des laboratoires périphériques ; ces prélèvements étaient acheminés avec retard et n'étaient pas conservés à 4 °C ;
- le kit de décontamination Mycoprep contient du NaOH à 2 %, soit une concentration finale de 1 %, laquelle concentration paraît insuffisante pour réduire le taux de contamination en dessous de 10 % lorsqu'on travaille avec un milieu liquide (19). L'étude de BONARD (4), réalisée avec le même kit, a montré un taux de contamination de 3,7 % avec le MGIT et 25 % avec le LJ. CORNFIELD (5), travaillant sur une solution de NaOH à 4 %, avait obtenu un taux de contamination de 29 %, ce taux a été réduit à 12 % lorsque la concentration de NaOH a été augmentée à 6 % ;
- la richesse du milieu de base de MGIT comparée à celle du Bactec 460TB favorise non seulement la croissance des mycobactéries mais aussi celle des autres bactéries (9). Ainsi, pour l'utilisation du MGIT, la concentration de l'agent de décontamination doit être adaptée en fonction des habitudes d'un laboratoire.

Le MGIT comporte deux avantages : la sensibilité et la rapidité de détection. La plupart des études menées pour l'évaluation du MGIT comportaient deux biais en faveur du MGIT :

- la taille de l'inoculum qui n'était pas la même sur les 2 milieux 0,1-0,2 ml, pour le LJ et 0,5 ml pour le MGIT ;
- la lecture des milieux qui n'était pas faite à la même fréquence. En procédant à la lecture simultanée des deux milieux et en équilibrant la taille de l'inoculum pour les deux milieux, 0,4 ml pour le LJ et 0,5 ml pour le MGIT, on a obtenu un résultat toujours en faveur du MGIT. De plus, TAKAHASHI (18) et ROBERTS (13), en utilisant pour le milieu liquide un inoculum inférieur à celui des milieux solides puis un même volume d'inoculum pour les deux milieux, ont montré que l'inoculum n'avait aucune influence sur les deux types de milieux.

En terme de coût, le LJ a un coût moins élevé que le MGIT, mais celui-ci a l'avantage d'être prêt à l'emploi, tandis que le LJ nécessite une préparation fastidieuse et des œufs de bonne qualité (ce qui est toujours difficile à assurer et/ou à trouver). En nous basant sur ces résultats, nous pouvons conclure que le MGIT offre deux bonnes caractéristiques : la rapidité et la sensibilité ; celle-ci sont similaires à celles qui sont observées avec le Bactec 460TB. En plus de sa simplicité d'utilisation, l'absence de radioactivité fait du MGIT une alternative au Bactec 460TB comme milieu liquide.

Remerciements

Au Professeur Raymond AUCKENTHALER (Hôpital universitaire de Genève) et au Docteur Salmane H. SIDDIQI pour leurs contributions. À Becton Dickinson pour les réactifs MGIT.

Références bibliographiques

- BADAK FZ, KISKA DL, O'CONNEL MA *et al.* - Confirmation of the presence of *M. tuberculosis* and other mycobacteria in MGIT by multiplex Strand Displacement Amplification. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 1239-1243.
- BADAK FZ, KISKA DL, SETTERQUIST S, HARTLEY C, O'CONNEL MA & HOPFER RL - Comparison of MGIT with Bactec 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 2236-2239.
- BERGMANN JS & WOOD GL - Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR *M. tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 1083-1085.
- BONARD D, AKEDIER E, BAMBA L, YAYO C, KOTTAN JB & COMBE P - Evaluation du milieu MGIT et du kit Mycoprep pour le diagnostic des infections à mycobactéries. In: abstracts de la 11^{ème} Cisma 1997. Abstr.A1078 p379-380.
- CORNFIELD DB, BEAVIS KG, GREENE JA, BOJAK M & BONDI J - Mycobacteria growth and bacterial contamination in MGIT and Bactec 460 culture systems. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 2068-2071.
- DEVALLOIS A, LEGRAND E & RASTOGI N - Evaluation of Ampli-cor MTB test as adjunct to smears and culture for direct detection of *M. tuberculosis* in the French Caribbean. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 1083-1085.
- GAMBOA F, MANTEROLA JM, VINADO B *et al.* - Direct detection of *M. tuberculosis* complex in non respiratory specimens by Gen-Probe Amplified *M. tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 307-310.
- KENT PT & KUBICA GP - *Public Health Mycobacteriology. A guide for level III laboratory*. Atlanta Georgia Centers for Disease Control, 1985.
- METCHOOK BG, NOLTE FS & WALLACE Jr RJ - *Mycobacterium*. In: MURRAY PR, BARON EJ, PFLALLER MA, TENOR FC, YOLKEN RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed, Washington DC ASM Press, 1995. pp 401-437.
- PALACI M, UEKI S, SATO DN, DASYLVA TELLES MA, CURCIO M & SYLVA EAM - Evaluation of MGIT for recovery and drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 762-764.
- PFYFFER GE, WELSCHER HM, KISSLING P *et al.* - Comparison of the MGIT with radiometric and solid culture for recovery of AFB. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 364-368.
- RIVERA AB, TUPASI TE, GRIMALDO ER, CARDANO RC & CO VM - Rapid and improved recovery rate of *M. tuberculosis* in MGIT with solid Lowenstein Jensen medium. *Tuberc Lung Dis*, 1997, **1**, 454-459.
- ROBERTS GD, GOODMAN LN, HEIFETS L, LARSH H *et al.* - Evaluation of Bactec radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* from acid fast smear positive specimens. *J Clin Microbiol*, 1983, **18**, 689-696.
- SAITO H, KASHIWABARA Y, KATAYAMA T, KWON H & TOMIOKA H - Rapid detection of AFB with MGIT. *Kekkaku*, 1996, **11**, 399-405.
- SATOSHI I, YOSHITSUGU I, SADAOKI Y, YOSHINORI H, KAORU S & NOBUO N - MGIT testing in conjunction with the Accuprobe or the Ampli-cor-PCR assay for detecting and identifying mycobacteria from sputum samples. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 2022-2025.
- SHINNICK TM & GOOD RC - Diagnostic Mycobacteriology Laboratory Practices. *Clin Infect Dis*, 1995, **21**, 291-299.
- STAGER CE, LIBONATI JP, SIDDIQI SH *et al.* - Role of solid media when used in conjunction with the Bactec system for mycobacteria isolation and identification. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**, 154-157.
- TAKAHASHI & FOSTER V - Detection and recovery of mycobacteria by a radiometric procedure. *J Clin Microbiol*, 1983, **18**, 689-696.
- WOBESER WL, KRAJDEN M, CONLY J *et al.* - Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 134-139.