

Première étude d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose au Bénin

D. Affolabi,*† G. Anyo,† F. Faïhun,* N. Sanoussi,* I. C. Shamputa,† L. Rigouts,† L. Kestens,† S. Anagonou,* F. Portaels†

*Laboratoire de Référence des Mycobactéries, Cotonou, Bénin ; †Mycobacteriology Unit and ‡Immunology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

R É S U M É

OBJECTIF : Evaluer la diversité génétique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* à Cotonou, Bénin, et les facteurs de risque associés au regroupement des souches en grappes.

MÉTHODES : Nous avons analysé les échantillons d'expectoration provenant de 194 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive admis de façon consécutive. Un échantillon par patient a été analysé avec au moyen de deux tests génotypiques : le spoligotypage et le « mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeats » (MIRU-VNTR) utilisant 12 loci. Les profils des souches obtenus ont ensuite été comparés à ceux de la base de données internationale SpolDB4.0.

RÉSULTATS : Nous avons observé que le spoligotype le plus fréquent à Cotonou est le spoligotype 61 suivi du type « Beijing », qui représente 10,3% des souches et qui est, par ailleurs, associé à la résistance à la streptomycine. Nous avons par ailleurs confirmé que la combinaison du spoligotypage et du MIRU-VNTR est plus discriminante que chacun des tests pris isolément.

CONCLUSION : Le spoligotype 61 et le type « Beijing » sont les génotypes les plus fréquents à Cotonou.

MOTS-CLES : épidémiologie moléculaire ; *Mycobacterium tuberculosis* ; Cotonou

LA PLUPART des 8,8 millions de nouveaux cas estimés de tuberculose (TB) et des 1,6 millions de décès annuels attribués à la TB partout dans le monde¹ surviennent dans les pays à faibles ressources, particulièrement en Afrique où la situation de la TB est aggravée par les conditions sociales, l'épidémie du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et l'émergence de souches multirésistantes (MDR ; définies comme résistantes au moins à l'isoniazide [INH] et à la rifampicine [RMP]).

Le Bénin est un pays d'Afrique de l'Ouest dont la population est estimée à 8,5 millions d'habitants. Cotonou est la plus grande ville du Bénin et compte environ un tiers des cas de TB détectés dans le pays. La stratégie DOTS a été mise en œuvre au Bénin depuis plusieurs années et couvre l'entière du pays. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le taux estimé de l'incidence de la TB a augmenté de 80 pour 100.000 habitants en 1990 à 88/100.000 en 2005 alors que le taux de cas détectés est resté presque le même (40/100.000 en 1990 comparé à 39/100.000 en 2005).¹ En 2006, la séroprévalence du VIH était de 1,8% dans la population générale² alors que parmi les patients TB, le taux était de 11% (rapport du Programme National TB [PNT], données non publiées).

Comme dans la plupart des pays à faibles ressources, l'épidémiologie de la TB au Bénin a consisté jusqu'ici à enregistrer le nombre de cas ainsi que leurs données démographiques. Dans ce pays, les connaissances sont rares au sujet de l'épidémiologie moléculaire de la TB ; par exemple, la base de données du spoligotypage Spol DB4,0 n'a publié que quatre souches sur les 39.609 entrées en provenance du Bénin.³ L'épidémiologie moléculaire pourrait pourtant nous aider à mieux comprendre la dynamique de la transmission de la TB en vue de la maîtrise de la maladie au Bénin.

De nombreuses méthodes ont été élaborées pour le génotypage de *Mycobacterium tuberculosis* ; la méthode de référence est le polymorphisme de longueur du fragment de restriction de la séquence d'insertion 6110 (IS6110-RPLP).^{4,5} Toutefois cette méthode est très laborieuse, son pouvoir discriminatoire est médiocre pour les souches qui comportent un faible nombre de copies de IS6110 et elle exige de grandes quantités d'ADN. Le spoligotypage est une méthode plus simple basée sur une réaction par polymérase en chaîne (PCR), mais elle est moins discriminatoire que IS6110-RPLP.⁶ Une autre méthode (MIRU-VNTR)⁷ basée sur la PCR a été largement utilisée. Il

Auteur pour correspondance : Dissou Affolabi, Laboratoire de Référence des Mycobactéries 01, BP 817 Cotonou, Bénin. Tel : (+229) 21 33 15 33. Fax : (+229) 21 33 70 57. e-mail : affolabi_dissou@yahoo.fr

[Traduction de l'article : « First molecular epidemiological study of tuberculosis in Benin » Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13 (3): 317-322]

s'agit de la détermination du nombre variable de répétitions en tandem d'unités mycobactériennes répétitives dispersées en se basant sur 12 loci indépendants. Le pouvoir discriminatoire de cette méthode est comparable à celui de IS6110-RPLP si on la combine avec le spoligotypage.⁸⁻¹⁰ Bien que la résolution du MIRU-VNTR ait été récemment augmentée par l'emploi de 15 loci,¹¹ cette nouvelle combinaison de loci doit être évaluée davantage.

Cet article présente les résultats de la première étude d'épidémiologie moléculaire menée sur des isolats TB en provenance de patients du Bénin pour évaluer la diversité des souches de *M. tuberculosis* à Cotonou en utilisant deux méthodes de génotypage, le spoligotypage et le MIRU-VNTR sur 12 loci.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Patients

Entre juillet 2005 et octobre 2006, les échantillons provenant de 201 nouveaux cas de TB à bacilloscopie positive ont été inclus dans l'étude. Tous les patients résidaient à Cotonou ou dans ses banlieues. On a recueilli et analysé deux échantillons de crachats par patient, mais on n'a utilisé qu'une seule culture positive par patient pour les tests de sensibilité aux médicaments (DST) et pour les empreintes digitales de l'ADN. On a recueilli chez chaque patient les données démographiques et un échantillon de sang pour le test VIH qui a été réalisé par un test immunoenzymatique (ELISA). Les échantillons séropositifs ont été confirmés par un test discriminatoire HIV1/2 (Genie II HIV1/ HIV2®, Biorad, France).

Culture et DST

Pour chaque patient, deux échantillons de crachats ont été décontaminés en utilisant la méthode de Petroff modifiée¹² et mis en culture dans un Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) manuel (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)¹³ et sur le milieu de Löwenstein-Jensen (LJ). On a déterminé la sensibilité des isolats de *M. tuberculosis* (un isolat par patient) à l'égard de la RMP, de l'INH, de la streptomycine (SM) et de l'éthambutol (EMB) par la méthode des proportions sur le milieu de LJ en utilisant les concentrations suivantes : 40 µg/ml pour la RMP, 0,2 µg/ml pour l'INH, 4 µg/ml pour la SM et 2 µg/ml pour l'EMB.¹⁴ L'Institut de Médecine Tropicale à Anvers, Belgique a réalisé chaque année le contrôle de qualité pour le DST.

Empreintes digitales de l'ADN

On a extrait l'ADN en transférant deux gouttes de culture positive prélevée à partir du tube MGIT dans 300 µl de 10 mM tris-HCl et 1 mM EDTA (1 × TE) et on a tué les bacilles en faisant bouillir la suspension pendant 5 minutes. Le spoligotypage a été réalisé selon la technique décrite précédemment,⁶ et les données

obtenues ont été comparées à la base de données SpolDB4.0. Le MIRU-VNTR a été réalisé en amplifiant individuellement chacun des 12 loci selon la technique décrite précédemment et les résultats ont été combinés dans des profils d'allèles numériques.⁷

M. tuberculosis H37 Rv a été utilisé comme contrôle positif, l'eau et le contrôle du réactif comme contrôles négatifs.

Analyse statistique

Toutes les données ont été analysées en utilisant la version 9.05 de SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) et Epi Info 6.02 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Les risques relatifs bruts (RR) et leurs intervalles de confiance à 95% (IC 95%) ont été calculés pour évaluer l'association entre la disposition en grappe ou les souches Beijing et les différents facteurs. Les tableaux de contingence ont été analysés au moyen du test χ^2 de Pearson et les différences ont été considérées comme significatives lorsque P était $< 0,05$.

On a fait appel à procédure d'élimination rétrograde basée sur le ratio de probabilité pour sélectionner les variables à inclure dans les modèles de régression logistique. Les odds ratios (OR) ajustés et leurs IC 95% ont été dérivés des modèles logistiques finaux. Pour ces modèles, on a évalué la bonne qualité de l'ajustement en employant le test de Hosmer et Lemeshow.

Une grappe a est définie en présence de deux souches ou davantage dont les profils étaient identiques au spoligotypage et au MIRU-VNTR.

Considération éthique

Tous les patients ont donné un consentement éclairé. L'étude a été approuvée par l'Institutional Review Board du PNT du Bénin.

RÉSULTATS

Population de l'étude

Parmi les 201 nouveaux cas de TB pulmonaire recrutés, sept échantillons ont été exclus de l'analyse : la culture s'est avérée négative ou contaminée pour cinq échantillons et dans les deux autres on a mis en évidence une combinaison de doubles allèles dans plusieurs loci au MIRU-VNTR, suggérant une infection mixte. Le ratio femmes-hommes était de 3,4 ; l'âge des patients s'étalait de 17 à 69 ans avec un âge médian de 30 ans. Les test sérologiques du VIH ont été disponibles pour 190 patients, dont 27 (14,2%) étaient positifs au VIH-1, répartis en 10 femmes (37%) et 17 hommes (63%). Les 163 patients restants (85,8%) étaient séronégatifs pour le VIH.

Test de sensibilité aux médicaments

Les résultats du DST ont été disponibles pour 143 souches, parmi lesquelles deux (1,4%) étaient multi-

Tableau 1 Profil de résistance des souches

Type de résistance	n (%)
Monorésistant	
INH	3 (2,1)
SM	28 (19,6)
Polyrésistant	
INH + RMP	1 (0,7)
INH + EMB	1 (0,7)
INH + RMP + SM + EMB	1 (0,7)
Autres profils	0
Résistance totale INH + RMP (MDR)	2 (1,4)
Résistance totale	34 (23,8)
Sensibilité à tous les médicaments	109 (76,2)
Total	143

INH = isoniazide ; SM = streptomycine ; RMP = rifampicine ; EMB = éthambutol ; MDR = multirésistant.

résistantes (MDR), six (4,2%) étaient résistantes à l'INH, deux (1,4%) à l'EMB et 29 (20,3%) à la SM. Au total, 34 souches (23,8%) étaient résistantes à au moins un médicament et 109 souches (76,2%) étaient sensibles à l'ensemble des médicaments testés (Tableau 1). Des deux patients infectés par des souches MDR, le premier avait vécu à l'étranger et était revenu au Bénin peu de mois avant son diagnostic de TB ; le second avait toujours vécu au Bénin et était séronégatif pour le VIH.

Spoligotypage

On a identifié au total 95 spoligotypes distincts ; 126 souches (64,9%) ont été regroupées en 27 grappes, dont les tailles comportaient de 2 à 40 souches. Si l'on compare les spoligotypes obtenus avec ceux consignés dans la base de données internationale SpolDB4,0, les trois grappes les plus fréquentes ont été ST 61, ST 1 et ST 438, contenant respectivement 40, 17 et 8 souches (Tableau 2).

Parmi les 194 souches étudiées, on a identifié 62 nouveaux spoligotypes non encore décrits dans la base de données ; ils ont été répartis en 51 types isolés et 11 grappes regroupant au total 30 souches (une grappe de sept souches, une de quatre souches, une de trois souches et huit de deux souches ; Tableau 2).

Tableau 2 Spoligotypes

Spoligotypes	Profils	n (%)
Spoligotypes déjà décrits	33	113 (58,2)
En grappes	16	96 (49,5)
Isolés	17	17 (8,8)
Spoligotypes nouvellement décrits	62	81 (41,8)
En grappes	11	30 (15,5)
Isolés	51	51 (26,3)
Total des isolés	68	68 (35,1)
Total des grappes	27	126 (64,9)
Total	95	194

MIRU-VNTR

Parmi les 194 souches, on a identifié 74 types distincts de MIRU-VNTR et regroupé 150 souches (77,3%) en 30 grappes dont les tailles comportaient de 2 à 20 souches.

Spoligotypage plus MIRU-VNTR

En combinant le spoligotypage et le MIRU-VNTR, 66 souches (34,0%) ont été regroupées en 14 grappes. Parmi les 40 souches avec ST 61, la combinaison du spoligotypage et du MIRU-VNTR a identifié 12 types isolés et 28 souches regroupées en quatre grappes comportant 15, 7, 4 et 2 souches. Toutes les souches avec ST 1 (famille Beijing) ont partagé le même type lors du MIRU-VNTR. Aucune des deux souches MDR n'a été regroupée dans une grappe (Figure).

Nous avons comparé également les caractéristiques comme l'âge, le sexe, le statut VIH et la résistance aux médicaments entre les souches isolées et celles regroupées en grappe. Lors de l'analyse univariée, on n'a pas trouvé d'association entre l'âge, le sexe ou le statut VIH et la disposition en grappes ; toutefois, les souches résistantes aux médicaments ont été plus susceptibles que les souches sensibles d'appartenir à des grappes (Tableau 3). En effet 42,6% des souches disposées en grappes se sont avérées résistants à au moins un médicament testé alors que seulement 12,4% des souches non-disposées en grappes se sont avérées résistants ($P < 0,001$; RR = 2,38 ; IC 95% 1,63–3,47 ; Tableau 3). Lors de l'analyse multivariée, seule la résistance à au moins un médicament a été en association significative avec la disposition en grappes (OR ajusté = 4,71, IC 95% 2,06–10,77). De plus les souches Beijing ont été plus susceptibles d'être en association avec la résistance à au moins un médicament testé ($P < 0,001$; RR = 7,34 ; IC 95% 4,59–11,74).

Les test de sensibilité ont mis en évidence la monorésistance à la SM (le type le plus courant de résistance) dans toutes les souches 17 ST, dans une des deux souches ST 255, dans cinq des souches 38 ST 61, dans la souche STI 540 et dans sept des 70 souches n'appartenant pas à des grappes.

Tableau 3 Risque relatif brut et IC 95% de grappes chez les patients

Caractéristiques épidémiologiques	Patients infectés par :		RR brut (IC 95%)	Valeur P
	Souches en grappes n (%)	Souches non-en grappes n (%)		
Sexe masculin	51 (77,3)	99 (77,3)	1,00 (0,62–1,59)	NS
VIH positif	12 (19,0)	15 (11,8)	1,42 (0,88–2,29)	NS
Age <30 ans	33 (50,0)	58 (45,3)	1,13 (0,77–1,67)	NS
Résistance aux médicaments	23 (42,6)	11 (12,4)	2,38 (1,63–3,47)	<0.001

RR = risque relatif ; IC = intervalle de confiance ; NS = non significatif ; VIH = virus de l'immunodéficience humaine.

Profil spoligotype	Patients n	Profil MIRU	Spoligotype	Profil spoligotype	Patients n	Profil MIRU	Spoligotype
7 0 0 0 7 6 7 7 7 7 6 0 7 0 0	1	224424242231	200	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223325153322	61
7 0 0 0 0 0 7 6 5 6 7 4 1 7 1	1	224434244221	*	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223315163321	61
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 7 0 7 1	3	224424244221	438	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223424244221	61
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 7 0 7 1	1	224524244221	438	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	224424244221	61
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 7 0 7 1	1	224424244221	438	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	224224243221	61
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 7 0 7 1	1	224524244221	438	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	227234263521	61
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 7 0 7 1	1	221524244221	438	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 3 1	1	223315153323	403
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 7 0 7 1	1	223225153324	438	7 1 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223315153321	*
7 7 4 0 7 7 7 7 7 5 7 0 7 1	1	224424244221	*1	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 5 1	1	223315133321	838
7 7 4 0 7 7 7 7 7 5 7 0 7 1	1	227524244221	*1	7 7 7 7 7 7 7 6 7 6 4 7 7 1	1	223315153321	*
7 7 4 0 6 7 7 7 7 7 7 0 7 1	1	224524244221	*	7 7 7 7 7 0 3 4 3 7 4 0 7 7 1	1	223315153223	*8
7 3 4 0 7 7 7 7 7 7 7 1 0 7 1	2	224424244221	*2	7 7 7 7 7 0 3 4 3 7 4 0 7 7 1	1	223315153323	*8
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 5 0 7 1	1	224424242221	437	7 7 7 7 7 0 3 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223315153223	*
7 7 4 0 7 7 7 7 7 7 5 0 7 1	1	224325153323	437	7 7 7 7 7 7 7 4 3 7 4 0 1 7 1	1	223215143313	*
0 0 0 0 0 7 7 7 7 7 7 5 0 7 1	1	224424242221	*	7 6 1 3 7 7 7 4 3 7 6 0 7 3 1	1	223315153323	*9
7 1 4 0 7 7 7 7 7 7 0 0 1 1	1	224524244221	*	7 6 1 3 7 7 7 4 3 7 6 0 7 3 1	1	223323143322	*9
7 7 4 0 7 7 6 0 7 7 7 7 0 3 1	1	225424244221	330	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	1	223325143336	53
7 7 4 0 7 7 6 0 7 7 7 7 0 3 1	1	224414244221	330	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	1	225325153324	53
7 7 4 0 7 7 6 0 7 7 7 7 0 7 1	1	224424243221	331	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	1	225125113322	53
7 7 4 0 7 7 6 0 7 7 7 7 0 7 1	1	224424244221	331	6 5 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	1	223325143336	*
7 7 4 0 7 7 6 0 7 7 7 7 0 7 1	1	226224233522	331	7 7 7 7 7 7 4 7 7 7 6 0 7 7 1	1	223325143321	451
7 7 4 0 7 7 6 0 7 7 6 1 0 3 1	1	224424244221	*	7 7 7 3 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	1	223425143428	1166
5 3 4 0 7 7 6 0 7 7 7 7 0 7 1	1	224424243231	*	6 7 7 7 3 7 7 3 7 7 6 0 7 7 1	1	223225133323	*
7 7 0 0 0 3 7 0 7 7 7 7 0 0 1	1	224424243221	*	7 3 5 7 7 7 7 7 7 6 0 7 3 1	2	223325153221	432
7 7 0 0 0 3 6 0 7 7 7 7 0 7 1	1	224424243221	*	7 3 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 3 1	1	223325153221	838
7 7 4 0 4 5 6 6 7 7 7 5 6 0 1	1	223414244221	*	7 7 7 7 7 7 7 7 7 5 6 0 7 7 1	1	223328151321	462
7 7 4 2 7 7 7 7 7 7 7 0 7 1	1	223215143323	*	7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	4	225325153323	50
7 7 4 1 7 7 7 7 7 7 7 6 7 1	1	223315153321	*	7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 5 7 1	1	225325153323	463
7 7 0 3 7 7 7 7 7 7 7 6 7 1	1	223315153321	*3	7 7 7 7 7 6 7 7 7 6 0 7 7 1	1	223325153322	119
7 7 0 3 7 7 7 7 7 7 7 6 7 1	1	222315133321	*3	7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 3 1	1	225313154323	49
7 7 0 7 7 7 7 0 7 7 7 7 6 7 1	1	225424243522	326	7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 3 1	1	225313153323	49
7 7 0 7 7 7 7 0 7 7 7 7 6 7 1	1	224424243422	326	7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 6 7 1	2	224323153223	168
7 7 0 3 7 7 7 0 7 7 7 7 6 3 1	1	225424243522	*	7 7 3 3 7 7 7 7 7 2 0 6 7 1	1	224323153223	*
7 7 7 3 7 7 7 4 3 7 6 7 7 7 1	1	225424243522	*	7 7 7 7 3 7 7 7 7 2 0 7 3 1	1	223325153323	1135
7 7 0 7 7 4 0 3 7 7 7 7 6 7 1	1	227224253521	*	7 7 7 7 2 1 7 7 7 2 0 7 3 1	1	223325153323	*
7 7 0 7 7 7 7 7 7 7 7 6 7 1	1	227224242521	*	7 5 3 7 3 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223215143323	*
7 7 4 3 3 7 7 7 7 7 3 7 6 7 1	1	236224233522	*	7 7 7 3 7 7 7 0 3 7 6 0 7 7 1	1	224524243221	*
7 7 0 2 5 5 6 6 7 7 3 7 2 6 0 1	1	236224233522	*	7 6 1 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 3 1	1	224424244221	844
0 7 4 0 6 7 6 0 6 7 7 7 0 7 1	1	214123243221	*	7 3 7 3 6 7 7 7 7 6 0 6 6 1	1	224425144446	*
7 7 4 0 0 0 0 7 7 7 7 7 0 7 1	1	124424244221	*	0 7 7 7 7 7 7 7 6 0 2 0 7 3 1	1	223425143323	*
7 7 4 0 0 0 0 7 7 7 7 7 0 3 1	1	124424244221	146	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 1	1	222424244221	523
7 7 4 0 0 0 0 7 7 7 7 7 0 3 1	1	224524243221	146	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 4 1 3 7 3 1	1	225424244221	48
5 7 4 0 0 0 0 7 7 7 7 7 0 3 1	1	124424244221	*	6 7 7 7 7 7 7 7 7 4 1 3 7 7 1	1	255325223433	342
7 7 4 0 0 0 2 7 7 7 7 2 3 1	1	124424244221	*	6 7 7 7 7 7 7 7 3 7 4 1 3 7 7 1	1	255324223433	342
7 7 4 0 0 0 0 7 7 7 7 2 3 1	1	124424244221	*	6 7 7 7 7 7 7 7 3 7 4 1 3 7 7 1	1	254325223433	342
7 7 4 0 0 0 7 7 7 7 7 0 3 1	1	124424244221	*	6 7 7 7 7 7 7 7 7 4 5 3 7 7 1	1	255325223433	*
7 7 4 0 4 0 0 7 7 7 7 7 0 7 1	2	222414244221	*4	6 7 7 7 7 7 7 7 3 7 4 1 3 7 7 1	1	255325223433	*
7 7 4 0 4 0 0 6 7 7 7 7 0 7 1	1	221424244221	*	7 7 7 7 4 0 0 1 7 7 6 0 7 7 1	1	125326153222	159
7 1 0 0 4 4 0 1 7 3 7 7 0 6 1	1	225424244221	*	6 7 7 7 7 4 7 6 0 0 0 1 3 1	1	223425151321	*
7 1 0 0 4 7 7 7 7 7 7 6 6 1	1	226224233522	*	7 7 7 7 7 6 7 7 0 0 0 0 0 0 1	1	325225153323	450
7 7 0 0 4 7 7 7 7 7 7 6 6 1	1	224424243221	*	7 7 7 7 7 0 0 0 0 0 0 0 7 3 1	1	212325153324	1204
7 0 0 0 0 1 7 7 7 7 7 6 4 0 2	2	225424243522	*5	7 7 7 7 5 0 0 0 0 0 0 0 7 3 1	1	233325153223	*
7 7 4 0 7 4 0 0 4 0 3 7 0 7 1	1	224424244221	*6	7 7 4 0 7 7 4 0 0 6 0 3 0 3 1	1	224524243221	*
7 7 4 0 7 4 0 0 4 0 3 7 0 7 1	1	225424244221	*6	7 7 4 1 7 7 4 0 1 7 2 3 0 3 1	1	221424244221	*
7 7 4 0 7 4 0 0 4 0 3 7 0 7 1	1	225524244221	*6	7 7 4 0 7 7 6 0 0 0 0 0 0 3 1	3	224424244221	*10
7 7 4 0 7 4 0 0 4 0 3 7 0 7 1	1	224414234221	*6	3 7 4 0 7 7 6 0 0 0 0 0 0 1 1	1	224414244221	*
7 7 4 0 7 4 0 0 4 0 3 7 4 7 1	1	225424244221	*	7 7 4 1 7 7 7 0 0 0 0 0 0 3 1	1	224424244221	*
7 3 4 0 7 4 0 0 4 1 3 7 0 7 1	1	225424244221	*	7 7 0 0 0 3 4 0 0 0 0 0 3 0 7 1	2	224524243221	*11
7 7 4 0 7 4 0 0 4 0 3 7 0 6 0 1	1	225424244221	*7	7 7 0 0 0 3 4 0 0 0 0 0 3 0 7 1	1	224424243221	*11
7 7 4 0 7 4 0 0 4 0 3 7 0 6 0 1	1	223325163533	*	7 7 0 0 0 3 4 0 0 0 0 0 3 0 7 1	1	224524233221	*11
7 7 4 0 7 7 4 0 4 3 7 0 3 1	1	222315153323	*	7 7 0 0 0 3 4 0 0 0 0 0 3 0 7 1	1	224424244221	*11
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	7	223315153321	61	7 7 0 0 0 3 4 0 0 0 0 0 3 0 7 1	1	124424244221	*11
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223215153321	61	7 7 0 0 0 3 4 0 0 0 0 0 3 0 7 1	1	223315153323	*11
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223315153021	61	4 0 0 0 0 3 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223315153323	852
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	15	223315153323	61	0 0 0 0 0 0 0 0 7 7 2 0 7 3 1	1	225313153323	830
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223315152324	61	7 7 4 0 4 0 0 7 0 0 0 0 0 0 1	1	224424254221	*
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223315153324	61	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3 7 7 1	17	223325163533	1
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	4	223215153323	61	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3 6 7 1	1	223325163533	255
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223215143323	61	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3 6 7 1	1	225424244221	255
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	1	223215153313	61	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3 0 3 1	1	223325163533	540
7 7 7 7 7 7 4 3 7 6 0 7 7 1	2	223315133323	61				

Figure Combinaison des spoligotypes et des types MIRU. * Spoligotypes non encore décrits ; MIRU = unité mycobactérienne répertoriée dispersée.

DISCUSSION

Cette étude a été menée afin d'obtenir un premier aperçu en matière d'épidémiologie moléculaire de la TB à Cotonou, Bénin, ainsi que les facteurs de risque en association avec l'existence de grappes dans cette ville.

Comme dans d'autres études,^{9,15} ces résultats montrent que la combinaison du spoligotypage et du MIRU-VNTR a un pouvoir discriminatoire plus important que chacune des deux techniques individuelles. Pour cette raison, nous avons choisi la combinaison de ces deux techniques pour l'analyse de la biodiversité des souches de *M. tuberculosis* à Cotonou.

En utilisant cette combinaison, nous avons trouvé un niveau relativement bas de souches appartenant à des grappes (34%), ce qui suggère un faible taux de transmission récente de la TB. Une étude réalisée en Tanzanie en utilisant IS6110-RFLP a trouvé un pourcentage similaire (33%), alors que d'autres études africaines ont trouvé un pourcentage plus élevé de grappes, comme l'étude récente dans un pays voisin, le Burkina Faso, utilisant les mêmes techniques moléculaires, où 53,3% des souches étaient disposées en grappes.^{9,15-22} Bien que la proportion de souches regroupées en grappes dans une population est supposée refléter le taux de transmission récente de la TB, cette hypothèse est parfois discutable. Dans notre contexte, le faible niveau des souches disposées en grappes, comparable à celui signalé dans les pays industrialisés,²³⁻²⁵ pourrait être attribué non seulement à la prépondérance des réactivations d'infections anciennes mais aussi aux efforts de détection précoce des cas de TB par le PNT.

La comparaison des spoligotypes trouvés dans cette étude avec la base de données internationale de spoligotypage a montré la plus grande prévalence du spoligotype ST 61 appartenant à la famille latino-américaine et méditerranéenne (LAM).³ On a décrit précédemment ce génotype comme prévalent dans les pays côtiers de l'Afrique de l'Ouest et en fonction de ces résultats, on a suggéré que des souches porteuses de ce génotype se seraient récemment répandues en Afrique de l'Ouest.^{9,26-28}

Nous n'avons trouvé aucune association entre la disposition en grappes et les données épidémiologiques comme l'âge, le sexe et le statut VIH. De nombreuses études, particulièrement dans les pays industrialisés, ont identifié des facteurs tels que le jeune âge, le sexe masculin et le statut VIH comme étant associés aux grappes, en contraste avec les pays en développement,²⁹⁻³¹ où différentes études n'ont pas trouvé d'association entre ces facteurs et la disposition en grappes.^{9,15} Bien que les deux seules souches MDR décrites ici ne faisaient pas partie d'une grappe, la résistance aux médicaments s'est avérée en association significative avec la disposition en grappe, particulièrement au sein de la famille W-Beijing.

Les souches de la famille W-Beijing n'avaient été que très rarement isolées dans les pays côtiers de l'Afrique de l'Ouest.^{9,26,28} Dans cette étude, la proportion a été de 10,3% et presque toutes les souches étaient résistantes à la SM. Selon l'information donnée par les patients, la plupart de ceux chez qui des isolats abritaient les souches Beijing de *M. tuberculosis* vivaient dans la même zone à Cotonou. Comme cette zone n'a pas été convenablement délimitée sur les cartes, il a été difficile de confirmer un lien épidémiologique entre ces patients. Toutefois, des investigations sont en cours pour caractériser davantage les souches et pour situer le lieu de résidence des patients grâce au Système d'Information Géographique (GIS). Les souches de la famille W-Beijing ont déjà été en association avec la résistance aux médicaments ;³² de plus, leur propagation rapide dans certains contextes suggère que cette famille est intrinsèquement virulente.

Dans cette étude, comme nous l'avions déjà démontré récemment, la prévalence de la MDR parmi les nouveaux cas a été faible à Cotonou, particulièrement chez les patients qui y vivent habituellement.³³ Ceci est probablement dû à l'application stricte de la stratégie DOTS au Bénin au cours de plusieurs années. Les taux de résistance aux médicaments trouvés dans cette étude sont similaires à ceux enregistrés à Cotonou en 2004 : résistance globale 25%, MDR 1,6% et résistance à la SM 20,1%.³³ Le niveau relativement élevé de résistance à la SM trouvé à Cotonou, ainsi que plusieurs autres pays africains, est probablement en relation avec l'utilisation fréquente des aminoglycosides peu coûteux pour le traitement des infections respiratoires autres que la TB.²⁸

Seuls les échantillons à bacilloscopie positive ont été inclus dans cette étude ; toutefois, il est possible que les résultats auraient pu être légèrement différents si nous y avions également inclus les échantillons à bacilloscopie négative et à culture positive.

En conclusion, ST 61, qui est fortement prédominant dans les souches de *M. tuberculosis* en Afrique de l'Ouest, est le génotype le plus prévalent à Cotonou, suivi par la famille Beijing qui dans cette population est en association avec la résistance aux médicaments et représente 10,3% de toutes les souches identifiées.

Références

- 1 World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. WHO/HTM/TB/2007.376. Geneva, Switzerland: WHO, 2007.
- 2 World Health Organization. HIV/AIDS epidemiological surveillance report for the WHO African Region. 2005 update. Geneva, Switzerland: WHO, 2005. <http://www.who.int/hiv/AFRO2005.pdf>
- 3 Brudey K, Driscoll J R, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 23.

- 4 van Embden J, Cave M, Crawford J, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendation for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406–409.
- 5 Van Soolingen D, Hermans P W M, de Haas P E W, Soll D R, van Embden J D. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2578–2586.
- 6 Kamerbeek J, Schools L, Kolk A, et al. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907–914.
- 7 Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36: 762–771.
- 8 Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2520–2524.
- 9 Godreuil S, Torrea G, Terru D, et al. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina Faso. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 921–927.
- 10 Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607–2628.
- 11 Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498–4510.
- 12 World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part III. Culture. Geneva, Switzerland: WHO, 1998.
- 13 Golubeva V, Lecocq M, Lassowsky P, Matthys F, Portaels F, Bastian I. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for direct and indirect drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from respiratory specimens in a Siberian prison hospital. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1501–1505.
- 14 Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 21–43.
- 15 Easterbrook P J, Gibson A, Murad S, et al. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4536–4544.
- 16 Gilks C F, Godfrey-Faussett P, Batchelor B I, et al. Recent transmission of tuberculosis in a cohort of HIV-1 infected female sex workers in Nairobi, Kenya. *AIDS* 1997; 11: 911–918.
- 17 Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer S C, et al. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. *Lancet* 2000; 356: 1066–1071.
- 18 Hermans P W M, Messadi F, Guebrexabher H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995; 171: 1504–1513.
- 19 Lockman S, Sheppard J D, Braden C, et al. Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana: a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1042–1047.
- 20 Tudó G, González-Martín J, Obama R, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Bata and Malabo districts of Equatorial Guinea. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1458–1463.
- 21 Wilkinson D, Pillay M, Crump J, Lombard C, Davies G R, Sturm A W. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Trop Med Int Health* 1997; 2: 747–753.
- 22 Yang Z H, Mtoni I, Chonde M, et al. DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1064–1069.
- 23 Bishai W R, Graham N M, Harrington S, et al. Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy. *JAMA* 1998; 280: 1679–1684.
- 24 Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, et al. Molecular approach of identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet* 1993; 342: 841–844.
- 25 Safi H, Aznar J, Palomares J C. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2472–2476.
- 26 Cadmus S, Palmer S, Okker M, et al. Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 29–34.
- 27 Diguimbaye C, Hilty M, Ngandolo R, et al. Molecular characterization and drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Chad. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1575–1577.
- 28 Niobe-Eyangoh S N, Kuaban C, Sorlin P, et al. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2547–2553.
- 29 Alland D, Kalkut G E, Moss A R, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1710–1716.
- 30 Pineda-Garcia L, Ferrera A, Hoffner S E. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2393–2397.
- 31 Small P M, Hopewell P C, Singh S P, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1703–1739.
- 32 European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 736–741.
- 33 Affolabi D, Adjagba O A B G, Tanimomo-Kledjo B, Gninafon M, Anagonou S Y, Portaels F. Anti-tuberculosis drug resistance among new and previously treated pulmonary tuberculosis patients in Cotonou, Benin. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 1221–1224.