

CARACTÉRISATION DES SOUCHES DU COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISO-LÉES CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE TUBERCULOSE EXTRAPULMONAIRE DANS UN HÔPITAL UNIVERSITAIRE DE DAKAR, SÉNÉGAL

ABDOULKADER ISSIFI KOLLO¹, AWA BA DIALLO^{1,2}, GÉDÉON WALBANG OSSOGA^{1,4}, MAME YACINE FALL NIANG¹, AWA NDIAYE DIAWARA¹, ALIOU THIAM¹, MAKHTAR CAMARA^{1,2}, HALIMATOU DIOP NDIAYE^{1,2}, NDÉYE COUMBA TOURÉ KANE^{1,2}, CHEIKH SAAD BOUH BOYE^{1,2}, SOULEYMANE MBOUP^{1,2}, SEMBÈNE MBACKÉ³, AISSATOU GAYE DIALLO^{1,2}.

RESUME

INTRODUCTION : Au Sénégal peu de données sont disponibles sur les paramètres descriptifs cliniques et biologiques des patients atteints de tuberculose extra-pulmonaire (TBEP), particulièrement la diversité génotypique et les profils de sensibilité aux antituberculeux de première ligne (ATB) des souches de *Mycobacterium tuberculosis*.

MÉTHODOLOGIE : Divers échantillons cliniques d'origine extra-pulmonaire ont été collectés entre 2010 et 2015 lors du diagnostic de TBEP. Leur culture et la sensibilité aux ATB des souches obtenues ont été effectuées sur l'automate Bactec MGIT 960. Les isolats ont été caractérisés par la technique du Spoligotypage. Pour les analyses statistiques, les Odds ratios (OR), intervalles de confiance (IC) à 95 % et P-values (p) ont été calculés avec l'outil en ligne « MEDCALC Free statistical calculators ».

RÉSULTATS : Sur un total de 547 échantillons étudiés, la culture était positive pour 60. La tranche d'âge de 21 à 40 ans et le fait que les échantillons soient en majorité des pus, étaient les paramètres les plus significativement associés à la TBEP avec respectivement (OR 2,7589; IC 95 % 1,6018-4,7517; $p=0,0003$) et (OR 10,2926; IC 95 % 5,6617-18,7113; $p < 0,0001$). Sur les 43 profils de sensibilité aux ATB obtenus, 83,7 % des souches étaient sensibles à la fois à la streptomycine (STR), à l'isoniazide (INH), à la rifampicine (RIF) et à l'éthambutol (EMB), tandis que 9,3 %, 4,7 % et 2,3 % étaient respectivement monorésistantes à l'INH, à l'EMB et à la STR. Par ailleurs, plusieurs génotypes ont été caractérisés avec une prédominance des familles LAM, H et T.

CONCLUSION : Les paramètres descriptifs des patients associés à la TBEP doivent être pris en compte par les cliniciens pour la détection précoce de cette forme clinique. L'utilisation de l'INH doit être surveillée pour éviter l'émergence des souches multirésistantes. Les génotypes prédominants observés dans cette étude sont ceux qui circulent en majorité à Dakar et en Afrique en général.

Mots clés : Tuberculose extra-pulmonaire, âge, isolats, monorésistance, streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol, spoligotypage, Dakar

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX STRAINS ISOLATED AMONG EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS IN A UNIVERSITY HOSPITAL OF DAKAR, SENEGAL

BACKGROUND : In Senegal, few data are available on the clinical and biological descriptive parameters of patients with extra-pulmonary tuberculosis (EPTB), particularly the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains genotypic diversity and first-line antituberculosis drugs susceptibility profile.

METHODS : Various clinical specimens of extra-pulmonary origin were collected between 2010 and 2015 for EPTB diagnosis. Their culture and the antituberculosis drug susceptibility testing (DST) of MTB strains obtained were carried out on the automated Bactec MGIT 960 system. The isolates were characterized by the Spoligotyping technique. For statistical analyzes, Odds ratios (OR), 95% confidence intervals (CI) and P-values (p) were calculated with the online tool «MEDCALC Free statistical calculators».

RESULTS : Among 547 extrapulmonary clinical samples, 60 were positive to culture. The patient's age group of 21 to 40 years and pus samples were associated to EPTB with respectively (OR 2.7589; 95% CI 1.6018-4.7517; $p=0.0003$) and (OR 10.2926; 95% CI 5.6617-18.7113; $p < 0.0001$). Of 43 DST profiles obtained, 83.7% were simultaneously sensitive to Streptomycin (STR), Isoniazid (INH), Rifampicin (RIF) and Ethambutol (EMB) whereas 9.3%, 4.7% and 2.3% were monoresistant to INH, EMB and STR respectively. Several genotypes were involved in EPTB disease but LAM, H and T were the most predominant families.

CONCLUSION : The patient's descriptive parameters associated to EPTB should be taken into account by clinicians for the early detection of this clinical form of tuberculosis. The use of INH drug should be monitored to avoid multidrug resistant strains emergence. The predominant genotypes obtained were those circulating mainly in Dakar and Africa in general.

Keywords: Extrapulmonary tuberculosis, age, isolates, monoresistance, streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, spoligotyping, Dakar.

1: Laboratoire de Bactériologie-Virologie (LBV); CHNU Aristide Le Dantec de Dakar

2: Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontologie (FMPO); Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD)

3: Faculté des Sciences et Techniques (FST); Université Cheikh Anta Diop de Dakar 4. Ecole Normale Supérieure de Bongor-Tchad.

Auteur correspondant : Abdoukader Issifi Kollo, 30 Avenue Pasteur, BP 7325, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Aristide Le Dantec, Dakar Sénégal. Tel: (00221) 770970990. E-mail: papakader2011@hotmail.fr

INTRODUCTION

La tuberculose extrapulmonaire (TBEP) est définie selon les critères de classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme une infection causée par les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) et qui affecte les tissus et organes situés à l'extérieur du parenchyme pulmonaire [1]. Les sites d'infections extrapulmonaires comprennent généralement les ganglions lymphatiques, la plèvre et les zones ostéo-articulaires, bien que n'importe quel organe puisse être atteint [2]. A l'échelle mondiale, la TBEP représente entre 10% et 20% des cas de tuberculose (TB) chez les patients immunocompétents et plus de 50 % chez les personnes infectées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) [3]. En Afrique, sur 1,3 million de cas de TB notifiés par l'OMS en 2015, la part de la TBEP est d'environ 16% [4].

L'incidence de la TBEP semble liée à la région géographique, à l'ethnie mais aussi à la souche de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) [5]. Par ailleurs, des caractères démographiques comme l'âge et le sexe, la résistance aux antituberculeux (ATB), le statut immunitaire et l'infection à VIH pourraient être associés au risque de TBEP [6]. Avec le développement de la biologie moléculaire, plusieurs méthodes de génotypage des mycobactéries tuberculeuses ont été mises au point. L'une d'entre elles, le spoligotypage, offre l'avantage d'être simple, rapide avec un pouvoir discriminant acceptable [6]. Dans la plupart des cas, les différents génotypes obtenus par cette technique permettent de classer les souches par lignée phylogénétique.

Au Sénégal, il n'existe quasiment pas de données sur la diversité génotypique des souches du CMT isolées chez les patients atteints de TBEP ; le peu d'informations disponibles porte sur leur profil de sensibilité aux ATB de première ligne. Pour pallier ce manque de données, nous avons entrepris cette étude portant sur la caractérisation la plus fine possible de souches de MTB isolées d'échantillons de produits pathologiques extra pulmonaires d'origine humaine dans un Hôpital de Dakar (Sénégal).

L'objectif principal de ce travail était de déterminer les lignées phylogénétiques (familles ou sous-familles) des souches impliquées dans la survenue des cas de TBEP ; les objectifs secondaires portaient sur leurs profils de sensibilité aux ATB de première ligne, la répartition des cas de TBEP selon l'âge et le sexe des patients et selon la nature du produit pathologique dans lequel elles ont été isolées.

POPULATION - MATERIEL DE L'ETUDE

Population de l'étude

Un total de 547 patients a été inclus dans l'étude. Les produits pathologiques provenaient de patients

habitant la région de Dakar (Dakar ville et agglomérations). Le statut immunitaire ainsi que le statut des patients par rapport au traitement ATB n'ont pas été précisés pour une grande majorité des patients. Les patients de sexe masculin étaient au nombre de 304 tandis que ceux de sexe féminin étaient au nombre de 243. L'âge des patients varie de 1 à 92 ans.

Les échantillons de produits pathologiques (n=547) étaient composés de liquides : céphalo-rachidien (LCR) (n=17), d'ascite (n=80), pleural (n=102), péritonéal (n=5), péricardique (n=8), articulaire (n=7), de dialysat (n=3), d'épanchement (classifié « autre type d'échantillon ») (n=25); de sécrétions uro-génitales (n=157) ; de pus (n=132); de produits de pièce opératoire (n=5) et de moelle osseuse (n=6).

Matériel de l'étude

Les échantillons cliniques ont été collectés dans des tubes stériles de 5 ml et acheminés au Laboratoire dans des conditions aseptiques. Ces échantillons ont ensuite été décontaminés pour obtenir des culots qui étaient resuspendus dans des cryotubes de 2ml contenant du tampon phosphate stérile à pH 6,8 et conservés à -20°C.

Le milieu 7H9 Middle brook contenu dans un tube de 7 ml et le supplément de croissance [BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture (Becton Dickinson) (BD)»Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) ont été utilisés pour la culture en bouillon. Le milieu 7H9 Middle brook était conservé à température ambiante tandis que le supplément de croissance était réfrigéré à +4°C. L'appareil Bactec MGIT 960 a servi d'incubateur et de détecteur des cultures positives et négatives.

La culture sur milieu solide a été effectuée sur milieu Löwenstein-Jensen (LJ) qui était conservé au réfrigérateur à +4°C. Une étuve réglée à +37°C a servi d'incubateur. Les résultats de cette culture ont été observés visuellement (observation de colonies jaunes-beiges pour les cultures positive et autres types de colonies ou pas de colonies pour les cultures négatives).

L'identification des mycobactéries du CMT à partir des cultures positives a été effectuée à l'aide du kit TBcID (Becton Dickinson (BD), Sparks, MD, USA).

L'antibiogramme a été effectué à l'aide du milieu 7H9 Middle brook contenu dans un tube de 7 ml et du supplément de croissance SIRE MGIT 960. L'appareil Bactec MGIT 960 a servi d'incubateur et de détecteur de la sensibilité aux ATB de première ligne. Ces ATB étaient la Streptomycine (STR), l'Isoniazide (INH), la Rifampicine (RIF) et l'Ethambutol (EMB).

Quant au Spoligotypage, il a été effectué à l'aide d'un kit commercial (Isogen Biosciences®, BV, Maarsse the Netherlands now Ocimum Biosolutions).

MÉTHODOLOGIE DE L'ÉTUDE

Période – Lieu de l'étude

Cette étude rétro-prospective a été réalisée à l'Unité des Mycobactéries du Laboratoire de Bactériologie-Virologie (LBV) du Centre Hospitalier National Universitaire Aristide Le Dantec de Dakar, Sénégal. L'étude a concerné la période allant de janvier 2010 à décembre 2015.

Critères d'inclusion et de non inclusion des patients

Les patients inclus dans cette étude étaient ceux suspectés cliniquement d'avoir une TBEP et dont le bulletin d'analyse médicale était informatif sur les paramètres suivants : l'âge, le sexe et l'adresse du patient ; la nature du prélèvement ; le service demandeur ; le diagnostic posé par le clinicien. Les patients dont les bulletins d'analyse ne renseignaient pas sur les paramètres cités ci-dessus ont été systématiquement exclus de cette étude.

Culture - Identification des mycobactéries du CMT

Les échantillons cliniques inclus dans cette étude ont été décontaminés au préalable selon le protocole décrit par Kubica et Kent [7], puis conservés au Laboratoire à -20°C jusqu'au moment de leur ensemencement qui survenait dans la semaine même de leur collecte. Le jour de la mise en culture, 0,5 ml de chaque échantillon préalablement ramené à la température ambiante, était inoculé dans un tube à essai contenant 7 ml de milieu 7H9 Middle brook qui était incubé à +37°C dans l'automate Bactec MGIT 960; cet appareil signale les résultats de la culture avec le terme «+» pour les cultures positives et «-» pour les cultures négatives.

Afin d'optimiser les résultats de la culture, 100 µl de chaque échantillon décontaminé ont également été ensemencés sur milieu solide LJ puis incubé à +37°C dans l'étuve. Au bout de 4 à 8 semaines, en cas de culture positive, on observe à l'œil nu des colonies jaunes-beiges qui étaient systématiquement réensemencées dans un tube à essai contenant 7 ml de milieu 7H9 Middle brook en vue de leur identification par le test TBcID.

Enfin, les isolats étaient identifiés comme « mycobactéries tuberculeuses » à l'aide du test immunochromatographique TBcID (BD, Sparks, MD, USA) qui détecte l'antigène spécifique MPT64 des mycobactéries du CMT, conformément au protocole fourni par le fabricant [8].

Conservation des échantillons

Les culots de décontamination ont été congelés à -20°C afin de servir plus tard pour le test de sensibilité aux ATB et le spoligotypage.

Test de sensibilité aux antituberculeux de 1^{ère} ligne

La méthode SIRE MGIT 960 a été réalisée, selon le protocole fourni par le fabricant [9] sur chaque isolat correctement identifié. Les concentrations critiques des antituberculeux testés étaient les suivantes : 1µg/ml pour la STR; 0,1µg/ml pour l'INH; 1µg/ml pour la RIF et 5µg/ml pour l'EMB. L'interprétation des résultats (identification et antibiogramme) était faite automatiquement par le MGIT 960.

Spoligotypage

Nous avons d'abord procédé à l'extraction de l'ADN des mycobactéries isolées selon la méthode du cetyl tri méthyl ammonium bromide (CTAB), en suivant le protocole décrit par van Soolingen et al [10]. A l'aide du spectrophotomètre, la concentration d'ADN de chaque isolat a été ajustée à 10ng avant d'entamer le spoligotypage. Le spoligotypage proprement dit a été réalisé selon le protocole standard décrit par Kamerbeek et al [11]. A l'aide d'une feuille de calcul Microsoft Excel 2007, chaque spoligotype obtenu a été traduit en format binaire de 43 chiffres composé de « 1 » et « 0 » pour la présence et l'absence d'espaceur respectivement. En utilisant le site Web TB insight (http://tbinsight.cs.rpi.edu/bin_to_oct.html), les codes binaires ont été convertis en format octal. Pour déterminer le type du spoligotype ou «Spoligotype international type» (SIT) et les familles des souches MTB, le format octal a été utilisé. Les formats en octal obtenus dans notre étude ont été comparés avec ceux existant dans la base de données en ligne SITVIT2 (SpolDB4) de l'Institut Pasteur de Guadeloupe (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/query). Les spoligotypes inconnus et non classifiés dans la base de données en ligne SITVIT2 ont été analysés par le programme SPOT-CLUST qui détermine les plus probables familles ou sous familles des souches selon le modèle de la base de données SpolDB3 (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html) [12].

En résumé, le schéma ci-après offre une vue d'ensemble de la méthodologie utilisée lors de cette étude (Figure 1)

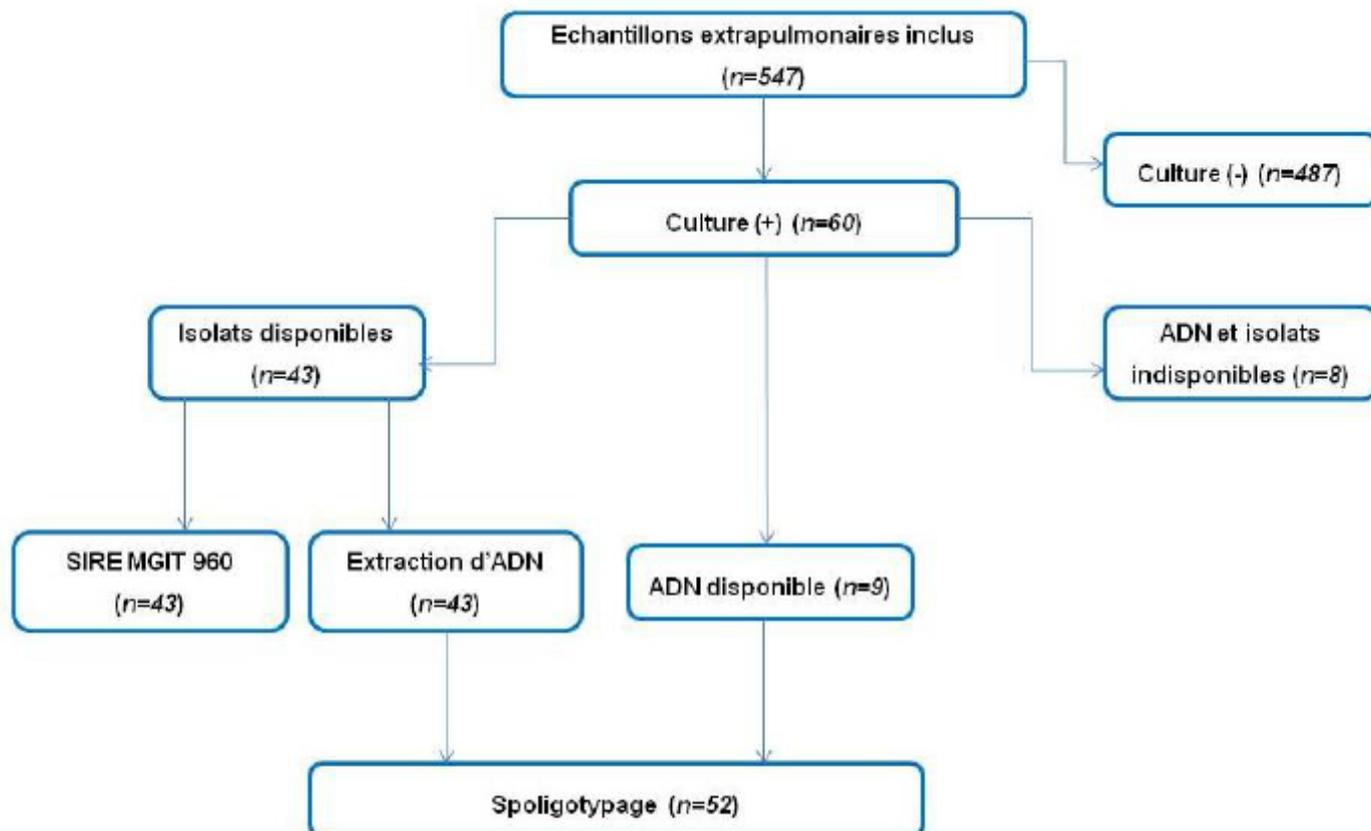


Figure 1 : Méthodologie générale de l'étude Analyse statistique

Pour évaluer l'association entre la TBEP et les différents paramètres descriptifs des patients, les Odds ratios (OR), intervalles de confiance (IC) à 95 % et P-values (p) ont été calculés à l'aide de l'outil en ligne « MEDCALC Free statistical calculators » (<https://www.medcalc.org/calc/>)

RÉSULTATS

Résultats globaux

Sur un total de 547 échantillons testés, la culture a été positive pour 60 (10,96 %). Parmi les 60 isolats obtenus, le test de sensibilité aux ATB de 1ère ligne a pu être pratiqué sur 43 et le spoligotypage sur 52. Les échantillons de pus représentaient 70% des cultures positives, suivis par les liquides pleuraux (10%) et les sécrétions uro-génitales (8,33%). Les pus étaient fortement associés à la TBEP (OR 10,2926; IC95 % 5,6617-18,7113 et $p < 0,0001$). Le groupe d'âge de 21 à 40 ans était associé à la TBEP (OR 2,7589; IC95% 1,6018-4,7517 et $p = 0,0003$) tandis que le sexe, les autres groupes d'âge et échantillons cliniques n'étaient pas significativement associés à la maladie ($p > 0,05$) (Tableau 1).

Tableau 1 : Corrélation TBEP et paramètres descriptifs des patients.

Paramètres descriptifs	Odds ratio (intervalles de confiance à 95%)	P-values	Cas confirmés de TBEP (%)
Sexe			
Masculin	1,0510 (0,6119-1,8053)	0,8570	56,66
Féminin	0,9515 (0,5539-1,6344)	0,8570	43,33
Groupes d'âge (ans)			
0-20	0,6105 (0,3306-1,1271)	0,1147	25
21-40	2,7589 (1,6018-4,7517)	0,0003	51,66
41-60	0,5166 (0,2471-1,0799)	0,0792	15
> 60	0,6858 (0,2636-1,7845)	0,4395	8,33
Types d'échantillons			
Liquide céphalo-rachidien	0,4989 (0,0650-3,8309)	0,5038	1,66
Liquide d'ascite	0,1808 (0,0433-0,7558)	0,0191	3,33
Liquide pleural	0,4525 (0,1891-1,0829)	0,0749	10
Liquide péritonéal	2,0466 (0,2250-18,6182)	0,5249	1,66
Liquide péricardique	2,7644 (0,5452-14,0156)	0,2196	3,33
Pus	10,2926 (5,6617-18,7113)	< 0,0001	70
Liquide uro-génital	0,2004 (0,0786-0,5105)	0,0008	8,33
Autres types d'échantillons	0,1665 (0,0225-1,2304)	0,0789	1,66

Les formes de TBEP identifiées à partir des 42 échantillons de pus étaient les suivantes : ganglionnaire (22 cas), ostéo-articulaire (10 cas), uro-génitale (4 cas),

Elles étaient suivies par SIT1/Beijing et SIT50/H3 (4 isolats chacune), SIT342/EAI5 (3 isolats), SIT42/LAM9, SIT2030/H1 et H3 (2 isolats chacune). La sous-famille LAM9 était à l'origine de l'unique cas de monorésistance à la STR. Les souches du CMT impliquées dans les deux cas de monorésistance à l'EMB appartenaient aux sous-familles H1 et EAI5. Les sous-familles LAM10, EAI5 et deux de la sous-lignée T1 étaient à l'origine des quatre cas de monorésistance à l'INH.

DISCUSSION

Nos données ont montré que les sujets âgés de 21 à 40 ans étaient les plus atteints par la TBEP (OR 2,7589, IC95% : 1,6018-4,7517 et $p = 0,0003$). Ailleurs en Afrique et dans le Monde, des études similaires ont aussi fait état d'un nombre élevé de patients souffrant de TBEP pour cette tranche d'âge [13-16]. En Afrique, 74% des tuberculeux à microscopie positive sont retrouvés dans la tranche d'âge de 15 à 44 ans [17].

Nos patients de sexe masculin dépassaient légèrement ceux de sexe féminin, bien que nous n'ayons pas noté d'association entre le genre et la TBEP. Ce constat a été fait par d'autres auteurs [18, 19]; les caractéristiques sociodémographiques des populations étudiées selon les régions du monde en seraient la cause.

Nos isolats provenaient surtout des pus (70%) d'origine ganglionnaire ou autre. Dans certains pays en développement voire émergents, la TB ganglionnaire serait la forme de TBEP la plus fréquente et ce le plus souvent chez les personnes vivant avec le VIH [18, 20, 21].

Les ATB de 1^{ère} ligne se sont révélés très actifs sur nos souches (83,73%). Le taux de monorésistance s'élevait à 16,27% et la molécule la plus concernée était l'INH, phénomène observé par d'autres auteurs, en particuliers chez les patients déjà traités [22, 23]. Et aucune souche multirésistante n'a été détectée.

Tout comme l'ont montré nos résultats, il ressort d'études menées à Dakar et ailleurs, qu'en Afrique les familles, LAM, H et T sont majoritairement retrouvées chez les patients tuberculeux et que les sous-familles SIT53/T1 et SIT60/LAM4 sont le plus souvent groupées en grappes [24, 25]. Les familles MAF (SIT324 / AFRI et SIT1954 / AFRI) détectées lors de notre étude ont déjà été isolées au Sénégal [26, 27]; leur prévalence serait en régression en Afrique, notamment au Sénégal [24, 28, 29].

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les localisations de la TBEP retrouvées en majorité lors de cette étude étaient respectivement ganglionnaire, ostéo-articulaire, uro-génitale, pleurale, abdominale, système nerveux central, péricardique,

cutanée et enfin multifocale; elles ont été détectées surtout dans les échantillons de pus et dans la tranche d'âge de 21-40 ans. Les cliniciens doivent tenir compte de ces deux paramètres pour la détection précoce de la maladie. Le constat que la résistance à l'INH soit la plus élevée suggère que l'utilisation de cet ATB en prévention ou en traitement doit être surveillée pour éviter l'émergence de la TB multirésistante. Divers génotypes étaient impliqués dans la survenue des cas de TBEP avec la prédominance des familles LAM, H et T. Ce type d'étude devrait être mené à l'échelle nationale en tenant compte du statut immunitaire (VIH) et du régime thérapeutique anti TB (patient naïf, primo-traitement, retraitement, rechute). Ce qui permettra de mettre en place une meilleure stratégie de lutte pour un contrôle efficace de la TBEP.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Projet WANETAM financé par EDCTP pour avoir pris en charge partiellement les coûts financiers de cette étude. Les auteurs remercient également le Programme National de lutte contre la Tuberculose (PNT) du Sénégal et le Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHNU Aristide Le Dantec pour leur contribution à la mise en œuvre de cette étude.

CONFLIT D'INTERET

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

RÉFÉRENCES

1. M Ramirez-Lapausa AM-S, A Noguerado-Asensio. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Rev Esp Sanid Penit.* 2015;17:3-11.
2. Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician.* 2005;72(9):1761-8.
3. Garedew L, Mihret A, Ameni G. Molecular typing of mycobacteria isolated from extrapulmonary tuberculosis patients at Debre Birhan Referral Hospital, central Ethiopia. *Scand J Infect Dis.* 2013;45(7):512-8.
4. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. 2016; [WHO/HTM/TB/2016.13]
5. Mazza-Stalder J, Nicod L, Janssens JP. [Extrapulmonary tuberculosis]. *Rev Mal Respir.* 2012;29(4):566-78.
6. Nicol MP, Wilkinson RJ. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(10):955-65.
7. Kent PT and Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory.* 1985.
8. Becton Dickinson and Company. *BD MGIT TBc Identification Test.* 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA. 2015. p. 5-8.

9. Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. MGIT™ Procedure Manual For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT). 2006:41-7.
10. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. 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(11):2578-86.
11. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.
12. Vitol I, Driscoll J, Kreiswirth B, Kurepina N, Bennett KP. Identifying Mycobacterium tuberculosis complex strain families using spoligotypes. *Infect Genet Evol.* 2006;6(6):491-504.
13. Tchaou M, Darre T, Mossi KE, Sonhaye L, Djibril M, Kotosso A et al. Extra-Pulmonary Tuberculosis: Retrospective Review of 83 Confirmed Cases, Observed in Radiology in Lomé (TOGO). *OJRad.* 2016;6:49-55.
14. Karstaedt AS. Extrapulmonary tuberculosis among adults: experience at Chris Hani Baragwanath Academic Hospital, Johannesburg, South Africa. *S Afr Med J.* 2013;104(1):22-4.
15. Sunnetcioglu A, Sunnetcioglu M, Binici I, Baran AI, Karahocagil MK, Saydan MR. Comparative analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis of 411 cases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14:34.
16. Cailhol J, Decludt B, Che D. Sociodemographic factors that contribute to the development of extrapulmonary tuberculosis were identified. *J Clin Epidemiol.* 2005;58(10):1066-71.
17. Mori T, Leung CC. Tuberculosis in the global aging population. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24(3):751-68.
18. Zenebe Y, Anagaw B, Tesfay W, Debebe T, Gelaw B. Smear positive extra pulmonary tuberculosis disease at University of Gondar Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Res Notes.* 2013;6:21.
19. Ade S, Harries AD, Trebucq A, Ade G, Agodokpessi G, Adjonou C et al. National profile and treatment outcomes of patients with extrapulmonary tuberculosis in Benin. *PLoS One.* 2014;9(4):e95603.
20. Sharma SK, Mohan A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004;120(4):316-53.
21. Yone EW, Kengne AP, Moifo B, Kuaban C. Prevalence and determinants of extrapulmonary involvement in patients with pulmonary tuberculosis in a Sub-Saharan African country: a cross-sectional study. *Scand J Infect Dis.* 2013;45(2):104-11.
22. Hafsa Afroz MAA, Md. Fakruddin, Kamrunnahar, Suvamoy Datta. Prevalence and treatment follow-up of drug-resistant extra-pulmonary tuberculosis in rural communities in Narshingdi, Bangladesh. *IJAM.* 2014;1(2):71-7.
23. Maurya AK, Kant S, Nag VL, Kushwaha RA, Dhole TN. Trends of anti-tuberculosis drug resistance pattern in new cases and previously treated cases of extrapulmonary tuberculosis cases in referral hospitals in northern India. *J Postgrad Med.* 2012;58(3):185-9.
24. Awa Ba Diallo, Ossaga Gedeon Walbang, Makhitar Camara, Seynabou Lo, Abigail Ayorinde, Aliou Niang et al. Molecular genotypes of Mycobacterium tuberculosis strains circulating in Dakar, Senegal. *Afr J Microbiol Res.* 2016;10(35):1460-6.
25. Groenheit R, Ghebremichael S, Svensson J, Rabana P, Colombatti R, Riccardi F et al. The Guinea-Bissau family of Mycobacterium tuberculosis complex revisited. *PLoS One.* 2011;6(4):e18601.
26. Niang MN, de la Salmoniere YG, Samb A, Hane AA, Cisse MF, Gicquel B et al. Characterization of M. tuberculosis strains from west African patients by spoligotyping. *Microbes Infect.* 1999;1(14):1189-92.
27. Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, Filliol I, Boula-hbal F, Vincent V et al. Genetic diversity of Mycobacterium africanum clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):57-65.
28. Gomgnimbou MK, Refregier G, Diagbouga SP, Adama S, Kabore A, Ouiminga A et al. Spoligotyping of Mycobacterium africanum, Burkina Faso. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(1):117-9.
29. Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Cunin P, Thonnon J, Sola C et al. Genetic biodiversity of Mycobacterium tuberculosis complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2547-53.