

# RÉSISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE TUBERCULOSE PULMONAIRE DANS SEPT RÉGIONS DU TCHAD

Gédéon Walbang Ossoga<sup>1,2\*</sup>, Awa Ba-Diallo<sup>1</sup>, Richard Ngandolo<sup>2</sup>, Makhtar Camara<sup>1</sup>, Halimatou Diop-Ndiaye<sup>1</sup>, Abdoukader Issifi-Kollo<sup>1</sup>, Moustapha Mbow<sup>1</sup>, Mame Yacine Fall-Niang<sup>1</sup>, Awa Ndiaye-Diawara<sup>1</sup>, Colette Diguimbaye<sup>2</sup>, Barou Djouater<sup>2</sup>, Ndeye Coumba Touré-Kane<sup>1</sup>, Souleymane Mboup<sup>1</sup>, Ibrahima Ndoye<sup>3</sup>, Aïssatou Gaye-Diallo<sup>1</sup>.

## RESUME

**OBJECTIFS:** Depuis 2003, la tuberculose est en expansion au Tchad et peu de données sont disponibles sur la résistance aux antituberculeux. L'objectif de cette étude était d'évaluer la résistance aux antituberculeux des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* isolées dans les villes suivantes : Moundou, Bongor, Sarh, N'Djamena, Mongo, Abéché et Doba.

**MÉTHODES:** Entre 2007 et 2012, les échantillons de crachat aux microscopies positives ont été collectés chez les patients nouveaux cas et en cours de retraitement. Après la culture, les kits génotype MTBC et MTBDRplus ont été utilisés pour identifier et tester la sensibilité des souches isolées.

**RESULTATS :** La population d'étude était de 497. Un total de 994 échantillons des crachats ont été mis en culture. Nous avons identifié 326 (65,59%) souches, dont 323 (99,08%) *M. tuberculosis* et 3 (0,92%) *M. africanum*. Les souches résistantes à au moins un antibiotique étaient 73 (22,39%). Nous avons identifié 17 (5,21%) souches monorésistantes à la Rifampicine et 42 (12,88%) monorésistantes à l'Isoniazide. La multirésistance (Rifampicine + Isoniazide) était observée chez 14 (4,29%) isolats. Les gènes de mutation identifiés étaient : *rpoB*(S531L) 8 (2,45%), *rpoB*(H526Y) 5 (1,53%), *rpoB*(H526D) 4 (1,23%), *katG*(S315T1) 23 (7,06%) et *inhA*(C15T) 19 (5,83%). Parmi les patients nouveaux cas, 16 (4,91%) souches étaient monorésistantes et 4 (1,23%) multirésistantes. Pour les patients en retraitement 43 (13,19%) souches étaient monorésistantes et 10 (3,07%) multirésistantes.

**CONCLUSION:** Cette étude a montré 5,21% des souches monorésistantes à la rifampicine, la première au Tchad. La stratégie DOTS doit être appliquée rigoureusement afin de dépister précocement les patients contagieux.

**Mots-clés :** Tuberculose; résistance; multirésistance; Tchad.

1. Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHNU Le Dantec, 30 Avenue Pasteur, BP 7325 Dakar, Sénégal.
2. Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha. BP: 433, N'Djaména (Tchad).
3. Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP: 5005 Dakar (Sénégal).

**Auteur correspondant :** Gédéon Walbang OSSO-GA, Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHNU Le Dantec, 30 Avenue Pasteur, BP 7325 Dakar, Sénégal. Téléphone : (+221) 77 565 00 73 / (+235) 63 12 53 62; e-mail: ossogagedeon@gmail.com

## ABSTRACT

### RESISTANCE TO ANTI-TUBERCULOSIS AMONG PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS IN SEVEN REGIONS OF CHAD

**OBJECTIVES:** Since 2003, tuberculosis is in expansion to Chad and data are scarce on resistance to anti-tuberculosis. The objective of this study was to evaluate resistance to anti-tuberculosis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the following cities: Moundou, Bongor, Sarh, N'djamena, Mongo, Abéché and Doba.

**METHODS:** Between 2007 and 2012, sputum samples to the positive microscopies were collected among new cases and retreatment cases of TB patients. After culture, the kits Genotype MTBC and MTBDRplus were performed to identify and test the sensitivity to *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated.

**RESULTS:** The study population was 497. A total of 994 sputum samples were processed for culture. We identified 326 (65.59%) strains, including 323 (99.08%) *M. tuberculosis* and 3 (0.92%) *M. africanum*. Resistant to at least one antibiotic strains were 73 (22.39%). We identified 17 (5.21%) strains monoresistant to rifampicin and 42 (12.88%) monoresistant to isoniazid. Multidrug resistance (rifampicin + isoniazid) was observed in 14 (4.29%) isolates. The mutation Genes identified were: *rpoB*(S531L) 8 (2.45%), *rpoB*(H526Y) 5 (1.53%), *rpoB*(H526D) 4 (1.23%), *katG*(S315T1) 23 (7.06%) and *inhA*(C15T) 19 (5.83%). Among patients new cases, 16 (4.91%) strains were resistant and 4 (1.23%) multidrug resistance. For patients in retreatment 43 (13.19%) strains were resistant and 10 (3.07%) multidrug resistance.

**CONCLUSION:** This study showed 5.21% strains monoresistant to rifampicin, the first in Chad. DOTS strategy should be rigorously applied in order to detect precociously the infectious patients.

**Keywords:** Tuberculosis; drug-resistant; multidrug-resistant; Chad.

## INTRODUCTION

La croissance de la tuberculose résistante aux anti-tuberculeux est un problème majeur de santé publique mondiale [1]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2012, 8,6 millions de personnes ont développé la tuberculose et 1,3 million en sont mortes. Cependant, l'Afrique, et plus particulièrement l'Afrique sub-saharienne compte la plus grande proportion de nouveaux cas de tuberculose par habitant, avec environ 1000 cas ou plus pour 100 000 habitants en Afrique du Sud et au Swaziland [2]. L'Afrique est aussi le seul continent où les taux de tuberculose augmentent, avec plus de 500 000 décès par an, dont beaucoup de jeunes, dans leurs années les plus productives [3]. Toutefois, le manque de la base

de données sur la résistance aux antituberculeux dans ces pays rend difficile le suivi [4]. La tuberculose multirésistante (TB-MR) est une forme de tuberculose causée par un bacille qui résiste à au moins l'isoniazide et la rifampicine, les deux antituberculeux de première ligne les plus efficaces. En 2012, 450 000 personnes ont développé la tuberculose multirésistante [2]. La résistance a un impact majeur sur le succès du traitement de la tuberculose. Alors que le traitement standard de première ligne soit très efficace pour la tuberculose sensible aux médicaments, le traitement de la tuberculose multirésistante nécessite l'utilisation des antituberculeux de deuxième ligne qui sont chers, et souvent associés à des effets secondaires graves [5].

Au Tchad, depuis les années 2003, la tuberculose est en nette expansion et cela constitue pour le pays avec des ressources fort limitées un épineux problème du développement [4]. En effet, l'incorrection des schémas thérapeutiques, le suivi insuffisant de malades et l'incapacité à assurer une bonne observance au traitement sont à l'origine de la tuberculose résistante aux antituberculeux. Au Tchad, peu de données sur les résistances sont disponibles et la prévalence de la tuberculose multirésistante est estimée à 1,9% en 2009 [6].

Le but de cette étude est d'évaluer la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* isolées dans les populations de sept régions du Tchad.

## MATÉRIELS ET MÉTHODE

### Considérations éthiques

Ce travail de recherche a été réalisé avec l'approbation de l'Hôpital Général de Référence National et celle du Ministère de l'Enseignement Supérieur. Les activités du Programme National de Lutte Contre la Tuberculose (PNT) étaient entièrement effectuées dans les hôpitaux où les collectes ont été effectuées. Les patients venaient se faire dépister volontairement et le traitement des malades était pris en charge par le PNT. A cet effet, les résultats obtenus ont été proposés dans le cadre du suivi de ces malades et cela avant d'être publié.

### Cadre d'étude

La culture des mycobactéries ont été réalisées dans l'unité de Mycobactéries du Laboratoire Vétérinaire et Zootechnique de Farcha à N'djaména (Tchad). Les identifications et les tests de sensibilité aux antituberculeux ont été réalisés dans l'unité de Mycobactéries du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar au Sénégal.

### Population d'étude et collecte des échantillons

Cette étude s'est déroulée entre 2007 et 2012 dans sept régions du Tchad: Abéché, Bongor, Doba, Mon-

go, Moundou, Sarh et N'Djamena. Pour cette étude, 497 patients à bacilloscopie positives ont été recrutés. Ces patients étaient composés de 399 nouveaux patients diagnostiqués et 98 cas admis pour un retraitement (rechute, échec et reprise après abandon). Nous avons collecté deux (2) échantillons de crachats par patient et nous avons obtenu 994 échantillons. Afin de réduire le taux de contamination et augmenter la positivité des cultures, une solution stérile à volume égal de 1% de Cétyl-pyridinium chlorure (Sigma-Aldrich) et de 2% du chlorure de sodium (Sigma-Aldrich) a été ajoutée à chaque prélèvement et acheminé au laboratoire par un service d'autobus [7].

### Culture de mycobactéries

Les échantillons des crachats ont été traités et mis en culture grâce à la méthode utilisée par Kubica [8]. Brièvement, les crachats ont été homogénéisés, fluidifiés et décontaminés avec une solution stérile contenant 4% de carbonate de sodium (Sigma-Aldrich) et 2.9% de citrate (Sigma-Aldrich) puis 0,5 % de N-Acétyle-L-cystéine (Sigma-Aldrich), ensuite neutralisé par le tampon phosphate (Becton Dickinson) stérile à pH6,8. Après centrifugation, les surnageants ont été décantés immédiatement avec soin et les culots ont été remis en suspension avec du tampon phosphate stérile à pH6,8. L'ensemencement a été fait sur deux milieux de cultures de Löwenstein-Jensen (Bio-Rad) : l'un contenant 0,75 % de glycérine (Panreac Quimica) et l'autre avec 0,2% de pyruvate (Sigma-Aldrich). Les souches des Mycobactéries isolées, étaient confirmées par la coloration de Ziehl Neelsen [9].

### Extraction de l'ADN et la PCR

Les colonies de Mycobactéries ont été prélevées sur le milieu solide de Löwenstein-Jensen et l'extraction de l'ADN a été réalisée par la méthode décrite par Kamerbeek [10]. En résumé, la suspension est préparée dans un tube de micro centrifugation de 2 ml contenant 450µl de Tris-Acide éthylène diamine tétra acétique (Tris-EDTA) (Sigma-Aldrich) et chauffée à 99°C pendant 20 minutes. Après refroidissement à température ambiante les cellules sont lysées par l'action du lysozyme (Sigma-Aldrich) à une concentration de 10 mg/ml à raison de 50 µl après une incubation à 37°C pendant toute la nuit sur l'agitateur de Khan. A cet effet, les protéines sont dénaturées pendant 40 minutes à 60°C grâce à l'addition de 100µl et 10µl respectivement de 20% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich) et de la protéinase k (Sigma-Aldrich). L'addition de 100µl de 5M NaCl (Sigma-Aldrich) et de 100µl de Bromure de N-cétyl-N, N, N, triméthyl ammonium (CTAB) (Sigma-Aldrich) et incubé pendant 10 minutes à 65°C permet de séparer les acides nucléiques des protéines. L'addition de 750 µl de chloroforme (Sigma-Aldrich) met les ADN en

suspension tout en les séparant des impuretés avec une interface. La phase aqueuse contenant l'ADN a été décanté dans un tube PCR de 1,5 ml. L'ADN a été rendu visible et précipiter par addition respective de 5µl de Glycoblue (Life Technologies) et de 550µl de l'isopropanol froid (-20 ° C) (Sigma-Aldrich). Les ADN extraits ont été quantifiés par le Spectrophotomètre (Nano Drop 2000c) (Thermo Scientific). La dilution a été faite pour obtenir une concentration finale de 10 ng d'ADN par millilitre de Tris-EDTA. Pour l'amplification par la PCR, la solution mère contenant tous les réactifs [Primers Nucléotides Mix, Tampon, MgCl<sub>2</sub>, eau de niveau de pureté pour Biologie Moléculaire (2QH<sub>2</sub>O), Taq polymérase] a été préparée en fonction du nombre d'échantillons à tester. Toutes les réactions PCR ont été préparées dans une enceinte de sécurité biologique stérile. Enfin le thermocycleur a été programmé selon les instructions données par les fabricants des kits Génotypes MTBC et MTBDRplus [11, 12].

### L'identification des espèces

Pour l'identification des espèces du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*, nous avons utilisé le kit Génotype MTBC version 2 (Hain Lifescience). Le test Génotype MTBC est un test qualitatif de diagnostic in vitro à partir de cultures pour la différenciation génétique des espèces/souches appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae* et *M. bovis* BCG). La procédure a été appliquée comme recommandé par les fabricants [13, 14].

### Caractérisation des résistances

Nous avons utilisé le kit génotype MTBDRplus version 2 (Hain Lifescience) qui permet d'identifier les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et de caractériser leur résistance à la rifampicine et / ou l'isoniazide à partir de la culture ou de prélèvements pulmonaires présentant un examen microscopique positif ou négatif. La mutation du gène chromosomique a été considérée comme la seule cause de la résistance aux antibiotiques chez *M. tuberculosis*, avec une résistance aux multiples antibiotiques qui sont la conséquence de l'accumulation séquentielle de mutations spontanées dans les gènes cibles. La résistance à la rifampicine est réalisée à travers la détection des principales mutations au niveau du gène *rpoB* (qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase) et les résistances de haut niveau et de bas niveau à l'isoniazide sont réalisées à travers l'analyse du gène *katG* et du promoteur du gène *inhA* (qui codent respectivement pour la peroxydase-catalase et la NADH enoyl ACP réductase). Les mutations dans ces deux gènes sont responsables d'environ 75% des cas de résistance de *M. tuberculosis* à l'isoniazide en milieu clinique [14, 15].

### Les analyses statistiques

Les bases des données ont été saisies dans le logiciel Microsoft Access 2007 et transférées dans le logiciel Epi Info 7™ (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, États-Unis) pour les analyses statistiques. Pour les variables quantitatives, il a été calculé la moyenne et l'écart type, les variables qualitatives ont été exprimées en proportion entouré de leur intervalle de confiance. Des analyses statistiques bi-variées ont été effectuées pour étudier la relation entre deux ou plusieurs variables qualitatives en utilisant le test de chi-deux ou le test de Fisher exact avec le calcul de la valeur de P-value. L'ensemble des tests et des analyses statistiques ont été effectués en utilisant un niveau de l'intervalle de confiance (IC) de 95%.

## RESULTATS

### L'analyse de la population d'étude et des souches isolées.

La population d'étude était de 497. Un total de 994 échantillons des crachats ont été traités et mis en culture. Nous avons obtenu 326 (65,59% [IC95%: 61,21-69,73]) cultures positives et 171 (34,41% [IC95%: 30,27-38,79]) cultures négatives. Les 326 souches appartenaient à 326 patients. Ces patients étaient composés de 270 (82,82% [IC95%: 78,19-86,67]) nouveaux cas et 56 (17,18% [IC95%: 13,33-21,81]) cas admis en retraitement. Cette population étude, comprenait 235 (72,09% [IC95%: 66,82-76,82]) hommes et 91 (27,91% [IC95%: 23,18-33,18]) femmes. Les âges allaient de 12 à 70 ans. La moyenne d'âge était de 32,3 ans avec un écart-type égal à 14,7.

### Le génotypage des Mycobactéries

Le génotypage a été effectué avec succès. Nous avons identifié 323 (99,08% [IC95%:97,11-99,76]) *M. tuberculosis* et 3 (0,92% [IC95%: 0,24-2,89]) *M. africanum*.

### Identification des gènes des mutations conférant la résistance à la Rifampicine et à l'Isoniazide

Nous avons identifié 73 (22,39% [IC95%: 18,06-27,39]) souches de *M. tuberculosis* résistant à au moins un des deux antibiotiques. La monorésistance à la Rifampicine a été observée chez 17 (5,21% [IC95%: 3,16-8,38]) souches et 42 (12,88% [IC95%: 9,54-17,13]) souches étaient monorésistantes à l'Isoniazide. La multirésistance (Rifampicine + Isoniazide) était identifié chez 14 (4,29% [IC95%: 2,46-7,27]) isolats.

Les gènes des mutations de *M. tuberculosis* responsables des résistances à la rifampicine et à l'isoniazide ont été caractérisés.



Tableau I : Répartition des résistances par cas, sexe et tranche d'âge.									
Tranche d'âge		12-21 ans	22-31 ans	32-41 ans	42-51 ans	52-61 ans	62 - <71 ans	Total	Type de résistance
		N (%) [IC 95%]	N (%) [IC 95%]	N (%) [IC 95%]	N (%) [IC 95%]	N (%) [IC 95%]	N (%) [IC 95%]	N (%) [IC 95%]	
Nouveaux cas	H		1 (0,31) [0,02-1,97]	1 (0,31) [0,02-1,97]		1 (0,31) [0,02-1,97]		3 (0,92) [0,24-2,89]	Mono-résistance à la Rifampicine
	F				1 (0,31) [0,02-1,97]				
Cas retraités	H		3 (0,92) [0,24-2,89]	2 (0,61) [0,11-2,44]	2 (0,61) [0,11-2,44]	3 (0,92) [0,24-2,89]	1 (0,31) [0,02-1,97]	11 (3,37) [1,78-6,13]	
	F	2 (0,61) [0,11-2,44]		1 (0,31) [0,02-1,97]	1 (0,31) [0,02-1,97]			4 (1,23) [0,39-3,33]	
Nouveaux cas	H	1 (0,31) [0,02-1,97]	2 (0,61) [0,11-2,44]	3 (0,92) [0,24-2,89]		2 (0,61) [0,11-2,44]		8 (2,45) [1,15-4,97]	Mono-résistance à l'Isoniazide
	F	1 (0,31) [0,02-1,97]	1 (0,31) [0,02-1,97]		2 (0,61) [0,11-2,44]			4 (1,23) [0,39-3,33]	
Cas retraités	H	1 (0,31) [0,02-1,97]	9 (2,76) [1,35-5,36]	6 (1,84) [0,75-4,16]	4 (1,23) [0,39-3,33]	4 (1,23) [0,39-3,33]	1 (0,31) [0,02-1,97]	25 (7,67) [5,12-11,25]	
	F		1 (0,31) [0,02-1,97]		2 (0,61) [0,11-2,44]			3 (0,92) [0,24-2,89]	
Nouveaux cas	H		2 (0,61) [0,11-2,44]			1 (0,31) [0,02-1,97]		3 (0,92) [0,24-2,89]	MDR (Rif + IHN)
	F	1 (0,31) [0,02-1,97]						1 (0,31) [0,02-1,97]	
Cas retraités	H	1 (0,31) [0,02-1,97]	3 (0,92) [0,24-2,89]	2 (0,61) [0,11-2,44]				6 (1,84) [0,75-4,16]	
	F			1 (0,31) [0,02-1,97]	1 (0,31) [0,02-1,97]	2 (0,61) [0,11-2,44]		4 (1,23) [0,39-3,33]	

H : Homme ; F : Femme ; MDR : Multirésistant ; Rif : Rifampicine ; IHN : Isoniazide ; IC 95% : Intervalle de Confiance de 95 pour-cent.

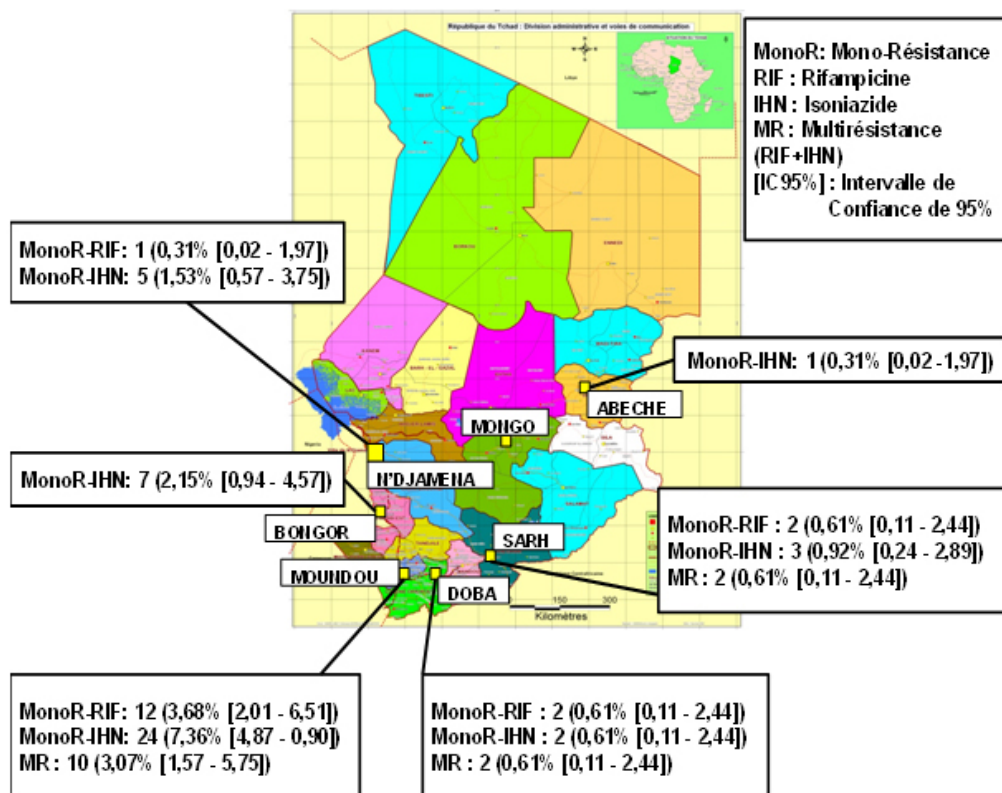


Figure 1 : Prévalence des types des résistances par région

**Tableau II :** Analyse d'association entre la maladie, le sexe et l'origine des patients.

Etude d'association	Rifampicine	Isoniazide	Multirésistance
	<i>P-value</i>	<i>P-value</i>	<i>P-value</i>
Sexes et la survenue de la maladie	0,41	0,19	0,12
Origine des patients et la survenue des souches résistantes	0,65	0,11	0,72

*P-value* : Valeur de la probabilité qui varie entre 0 et 1.

Pour la résistance à la rifampicine les mutations les plus fréquentes étaient observées dans les gènes *rpoB*(S531L) 8 (2,45% [IC95%: 1,15-4,97]) suivi de *rpoB*(H526Y) 5 (1,53% [IC95%: 0,57-3,75]) et de *rpoB*(H526D) 4 (1,23% [IC95%: 0,39-3,33]). Les mutations des gènes identifiées comme résistantes à l'isoniazide étaient observées dans *katG*(S315T1) 23 (7,06% [IC95%: 4,62-10,54]) et *inhA*(C15T) 19 (5,83% [IC95%: 3,64-9,10]). Les mutations simultanées, combinant les gènes *rpoB*(S531L) et *katG*(S315T1) responsable de la multirésistance étaient observées chez 7 (2,15% [IC95%: 0,94-4,57]) isolats.

Chez les nouveaux cas, les souches résistantes à un seul antibiotique étaient 16 (4,91% [IC95% :2,93-8,01]) et 4 (1,23% [IC95% :0,39-3,33]) multirésistantes. Les souches monorésistances à la rifampicine étaient 4 (1,23% [IC95% : 0,39-3,33]) et 12 (3,68% [IC95%: 2,01-6,51]) pour l'isoniazide.

Dans le cas des patients admis pour un retraitement les souches monorésistantes aux antibiotiques étaient 43 (13,19% [IC95%:9,81-17,47]) et 10 (3,07% [IC95% :1,57-5,75]) multirésistantes. Les monorésistances à la rifampicine et à l'isoniazide étaient observées chez 15 (4,60% [IC95%: 2,69-7,64]) et 28 (8,59% [IC95%:5,88-12,31]) isolats. La répartition des résistances pour les cas diagnostiqués par sexe et par tranche d'âge est présentée dans le (tableau 1).

### Le profil des souches résistantes par ville

Les 73 souches résistantes ont été réparties par ville et par ordre d'importance de fréquence. Suivant le profil : Moundou 46 (14,11% [IC95%:10,61-18,48]), Bongor 7 (2,15% [IC95%:0,94-4,57]), Sarh 7 (2,15% [IC95%:0,94-4,57]), N'djaména 6 (1,84% [IC95%:0,75-4,16]), Doba 6 (1,84% [IC95%:0,75-4,16]), et Abéché 1 (0,31% [IC95%:0,02-1,97]). Les profils des résistances stratifiés par région sont présentés dans la (figure1).

### Les mesures d'association

Les analyses bi-variées ont été réalisées pour étudier les relations entre le sexe et la survenue de la maladie ensuite entre l'origine des patients et l'apparition des souches résistantes. Les résultats de

ses analyses présentés dans le (tableau 2), avec les valeurs de ( $P > 0,05$ ) ont montré qu'il n'y avait pas d'association entre les sexes et la survenue de la maladie d'une part et d'autre part la survenue des souches résistantes et multirésistantes n'était pas liée à l'origine des patients.

## DISCUSSION

Cette étude a des limites à cause de la représentativité de l'échantillonnage, de la faible positivité des cultures et de la limitation aux deux antituberculeux majeurs. Mais nous pouvons dire que malgré ces limites et compte tenu de la rareté des informations sur la résistance au Tchad, l'étude pourra aider à orienter la politique nationale de prise en charge des patients tuberculeux. Nous signalons la monorésistance à la rifampicine des souches de *Mycobacterium tuberculosis* identifiée pour la première fois au Tchad. Au regard de la méthodologie, seuls les patients encours de retraitement antituberculeux et ceux naïfs de tout traitement présentant une microscopie positive ont été admis dans notre étude. Les échantillons de crachats collectés étaient un reflet adéquat des patients tuberculeux qui se sont présentés dans les hôpitaux des sept villes. Les patients étaient principalement composés des adultes avec une prédominance des hommes (61,36%).

Pour le test du kit génotype MTBC, seules les lignes colorées d'intensité environ égale ou supérieure à celle du Contrôle Universel ont été considérés comme interprétables [14]. La zone de réaction des bandes de la bandelette MTBC, qui s'hybride avec des amplicons générés à partir de tous les membres connus du complexe *M. tuberculosis*, ont été positifs pour l'ensemble des souches étudiées. Ce test a permis d'identifier 100% les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* isolées dans notre étude. En effet, une étude faite en Pologne a montré le même pourcentage d'identification que celui obtenu dans notre étude [16]. Décrit en 1968 à Dakar au Sénégal, *Mycobacterium africanum* reste toujours un pathogène majeur en Afrique [17]. Nous avons identifié 3 souches de *Mycobacterium africanum*, dont 2 isolées des patients de la ville de N'djaména et 1 isolée d'un patient provenant du village de Karwaye situé à la frontière du Cameroun. Dans une étude récente effectuée au Cameroun, *Mycobacterium africanum* a été identifié dans 2,3% des cas [18] versus 0,92% isolé dans notre étude. Ce taux obtenu au Tchad pourrait s'expliquer par les déplacements des deux populations. Selon African Medical and Research Foundation [3], les populations les plus exposées sont les pauvres des zones urbaines, les migrants et les réfugiés. En effet, dans la ville d'Abéché, une souche de *Mycobacterium tuberculosis* résistante à l'isoniazide a été isolé chez une patiente soudanaise venant du camp de réfugiés de Gaga à l'Est du

Tchad.

Le test de génotype MTBDRplus a montré une haute sensibilité de détection des mutants génétiques responsables de résistance à la rifampicine et à l'isoniazide [12].

Le taux global de résistance aux médicaments antituberculeux observé dans notre étude était de 22,39%. Il est très inférieur aux taux de 40% observés dans une étude récente en République Centrafricaine [19]. En effet, pour les souches résistantes à la rifampicine, les gènes de mutation obtenus dans notre étude étaient constitués majoritairement des gènes S531L (2,45%), H526Y (1,53%) et H526D (1,23%) mais nos résultats sont très inférieurs aux taux rapportés dans une étude réalisée au Burkina Faso : H526D (15,6%), H526Y (15,6%) et de S531L (9,4%) [20].

En ce qui concerne les isolats résistants à l'isoniazide, les gènes de mutation étaient : S315T1 (7,06%) et C15T (5,83%) et les mutations supérieures ont été observées dans une étude réalisée en Chine: S315T1 (48,5%) et C15T (30,3%) [13].

Une préoccupation majeure est la survenue de la tuberculose multirésistante puis associée à une augmentation des échecs de traitement et de rechutes en particulier dans les pays en développement [13]. Au Tchad, la mauvaise utilisation de la rifampicine et l'isoniazide dans la phase intensive du traitement des patients est certainement à l'origine des résistances et ce constat avait été souligné dans une étude récente au Burkina Faso [21]. Dans notre étude 4,29% des souches étaient multirésistantes. Certains pays comme le Cameroun (5,9%) [22] et l'Afrique du Sud (47,8%) [23] ont présenté des proportions plus élevée de tuberculose multirésistante. Les taux les plus faibles ont été observés en République démocratique du Congo (0,66%) [24]. La monorésistance à la rifampicine est rare, sauf chez les patients co-infectés de tuberculose/VIH ou d'autres conditions sous-jacentes [25]. Dans une étude précédente effectuée au Tchad, aucune monorésistance à la rifampicine n'a été observée [6], toutefois, dans notre étude, nous avons identifié 5,21% des isolats monorésistants à la rifampicine. Ces monorésistances à la rifampicine conduiront impérativement aux traitements appropriés des antituberculeux de deuxième ligne qui sont coûteux alors que le Tchad est un pays aux ressources très limitées.

Chez les patients nouveaux cas, 4,91% des souches ont été résistantes aux antibiotiques et 1,23% multirésistantes. Le taux supérieur à 4,91% a été observé au Maroc (8,3%) [26]. Pour la multirésistance (1,23%), le taux supérieur a été rapporté au Rwanda (7,0%) [27].

Les patients admis pour un retraitement étaient pris en charge par le Programme Nationale de Lutte contre la Tuberculose et la stratégie DOTS a été appliquée conformément aux recommandations de

l'OMS. Cependant, 13,19% des patients ont présenté une tuberculose résistante aux antibiotiques testés et 3,07% étaient multirésistants. Ces patients ont certainement développé une tuberculose chronique. Pour comparaison le taux le plus élevé à 13,19% a été observé au Burkina Faso (66,7%) [21] et le taux plus faible a été rapporté à Madagascar (11,5%) [28]. Le taux de multirésistance supérieur à 3,07% a été rapporté au Burkina Faso (50,5%) [21] mais très faible en Tanzanie (0,8%) [29].

Concernant le profil des souches résistantes par ville, la ville de Moundou avait le taux de résistance relativement élevée (14,11%) avec 12 souches monorésistantes à la rifampicine, 24 à l'isoniazide et 10 multirésistantes. Moundou est la capitale économique du sud et un centre d'échanges important de par sa proximité géographique avec le Cameroun et la République de Centre Afrique. Une étude récente faite par NGANGRO [30] a montré un fréquent abandon du traitement antituberculeux des patients à l'hôpital de Moundou. L'auteur a aussi signalé, une incapacité du système de soins à identifier les patients susceptibles d'avoir du mal à suivre leur traitement et à assurer la mise en place d'une stratégie DOTS de qualité suffisante. Cette étude peut déjà expliquer le taux de résistance élevé dans la ville de Moundou.

L'étiologie des relations entre les sexes et la maladie ensuite la provenance des patients et la survenue des résistances ont été étudiées. Nous n'avons trouvé aucune association entre la maladie et les données épidémiologiques comme les sexes et, la survenue des souches résistantes et multirésistantes n'était pas aussi liée à l'origine des patients.

## CONCLUSION

La tuberculose résistante aux antituberculeux est un véritable problème de santé publique au Tchad. Cette étude a montré 22,39% des isolats résistants à au moins un antituberculeux dans la population des six villes du Tchad. Le fait le plus marquant est l'identification des souches monorésistantes à la rifampicine obtenu dans notre étude, la première au Tchad. A cet effet, cette situation inquiétante interpelle le Programme National de Lutte contre la Tuberculose à développer un programme d'action plus efficace qui permettra d'évaluer périodiquement la tuberculose résistante aux antituberculeux afin de stopper son impact au sein de la population du Tchad.

## REMERCIEMENTS.

Nous remercions les directeurs des hôpitaux et les responsables des laboratoires des villes suivantes : Abéché, Bongor, Doba, Mongo, Moundou, Sarh et N'Djaménapour leurs collaborations à la réalisation de ce travail de recherche. Nous remercions également le Pr C. Bouke de Jong, Dr Amy Kristine Bei,



et Dr Fabien Niama Rockpour leurs analyses critiques et nous sommes reconnaissants au Dr M. Abdou Salam Mbengue pour ses analyses statistiques. Nous remercions également Le Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France au Tchad et l'École Normale Supérieure de Bongor (Tchad) pour leurs supports financiers.

## RÉFÉRENCES

1. Yang Y, Li X, Zhou F, Jin Q, Gao L. Prevalence of Drug-Resistant Tuberculosis in Mainland China: Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one* 2011; 6: e20343.
2. World Health Organization. 2013. The burden of disease caused by TB: 2013 global report on tuberculosis. WHO/HTM/TB/201311 Geneva, Switzerland.
3. African Medical and Research Foundation (AMREF): la Tuberculose: 2011-2012 Rapport annuel. [www.amref.fr/nos-publications/rapports-annuels/](http://www.amref.fr/nos-publications/rapports-annuels/).
4. Diguimbaye C, Hilty M, Ngandolo R, Mahamat HH, Pfyffer GE, Baggi F, Tanner M, Schelling E, Zinsstag J. Molecular Characterization and Drug Resistance Testing of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Chad. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1575-7.
5. Jenkins HE, Plesca V, Ciobanu A, Crudu V, Galusca I, Soltan V, Serbulenco A, Zignol M, Dadu A, Dara M, Cohen T. Assessing spatial heterogeneity of MDR-TB in a high burden country. *Eur Respir J* 2013; 42: 1291-301.
6. Abdelhadi O, Ndokaïn J, Moussa AM, Friocourt V, Mortier E, Heym B. Étude de la résistance de Mycobacterium tuberculosis chez les patients bacillifères au Tchad. *Biol Clin* 2011; 105: 16-22.
7. Smithwick RW, Stratigos CB, David HL. Use of Cetylpyridinium chloride and Sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the Laboratory for the isolation of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 411-3.
8. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1963; 87: 775-9.
9. Muddaiah RK, James PM, Lingegowda RK. Comparative study of Smear Microscopy, Rapid Slide Culture, and Lowenstein-Jensen culture in cases of pulmonary tuberculosis in a tertiary care hospital. *J Res Med Sci* 2013; 18: 767-71.
10. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
11. Machado D, Couto I, Perdigao J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, Veigas B, Amaral L, Viveiros M. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *PloS one* 2012; 7: e34538.
12. GenoType® MTBDRplus version 2. Nehren, Germany [www.hain-lifescience.com](http://www.hain-lifescience.com).
13. Huang WL, Chen HY, Kuo YM, Jou R. Performance Assessment of the GenoType® MTBDRplus Test and DNA Sequencing in Detection of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2520-4.
14. GenoType® MTBC version 2. Nehren, Germany [www.hain-lifescience.com](http://www.hain-lifescience.com).
15. Huyen MNT, Tiemersma EW, Lan NTN, Cobelens FGJ, Dung NH, Sy DN, Buu TN, Kremer K, Hang PT, Caws M, O'Brien R, Van Soolingen D. Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 149.
16. Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P, Chazan R, Grubek-Jaworska H. Diagnostic utility of the molecular assay GenoType MTBC (HAIN Lifescience, Germany) for identification of tuberculous Mycobacteria. *Pneumonol Alergol Pol* 2009; 77: 517-20.
17. Bentley SD, Comas I, Bryant JM, Walker D, Smith NH, Harris SR, Thurston S, Gagneux S, Wood J, Antonio M, Quail MA, Gehre F, Adegbola RA, Parkhill J, de Jong BC. The Genome of Mycobacterium Africanum West African 2 Reveals a Lineage-Specific Locus and Genome Erosion Common to the M. tuberculosis Complex. *PloS one* 2012; 6: e1552.
18. Kuaban C, Um Boock A, Noeske J, Bekang F, Eyangoh S. Mycobacterium tuberculosis complex strains and drug susceptibility in a cattle-rearing region of Cameroon. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18: 34-8.
19. Minime-Lingoupou F, Pierre-Audigier C, Kassa-Kélémbho E, Barilone N, Zandanga G, Rauzier J, Cadet-Daniel V, Le Faou A, Gicquel B. Identification rapide des isolats de germes tuberculeux multirésistants chez les patients en échec ou en rechute après traitement à Bangui, République Centrafricaine. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 782-5.
20. Miotto P, Saleri N, Dembelé M, Ouedraogo M, Badoum G, Pinsi G, Migliori GB, Matteelli A and Cirillo DM. Molecular detection of rifampin and isoniazid resistance to guide chronic TB patient management in Burkina Faso. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 142.
21. Sangaré L, Diandé S, Badoum G, Dingtounda B, Traoré AS. Résistance aux antituberculeux chez les cas de tuberculose pulmonaire nouveaux ou traités antérieurement au Burkina Faso. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 1424-9.
22. Meriki HD, Tufon KA, Atanga PN, Ane-Anyangwe IN, Anong DN, Cho-Ngwa F, Nkuo-Akenji T. Drug Resistance Profiles of Mycobacterium tuberculosis Complex and Factors Associated with Drug Resistance in the Northwest and Southwest Regions of Cameroon. *PloS one* 2013; 8: e77410.
23. Dorman SE, Chihota VN, Lewis JJ, Van der Meulen M, Mathema B, Beylis N, Fielding KL, Grant AD, Churchyard GJ. Genotype MTBDRplus for direct detection of Mycobacterium tuberculosis and drug resistance in strains from Gold Miners in South Africa. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1189-94.
24. Kabedi MJ, Kashongwe M, Kayembe JM, Mumba-Ngoyi D, Mampasi P, Mbaya P, Fissette K, Verhaegen J, Portaels F, Muyembe-Tamfum JJ. Résistance primaire de Mycobacterium tuberculosis aux anti-tuberculeux à Kinshasa, République Démocratique du Congo. *Bull Soc Pathol Exot* 2007; 100: 275-6.
25. Ahmad S, Al-Mutairi NM, Mokaddas E. Variations in the occurrence of specific rpoB mutations in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from patients of different ethnic groups in Kuwait. *Indian J Med Res* 2012; 135: 756-62.
26. Lahlou O, Millet J, Chaoui I, Sabouni R, Filali-Maltouf A, Akrim M, El Mzibri M, Rastogi N, El Aouad R. The Genotypic Population Structure of Mycobacterium tuberculosis Complex from Moroccan Patients Reveals a Predominance of Euro-American Lineages. *PloS one* 2012; 7: e47113.
27. Umubyeyi AN, Rigouts L, Zisis G, Kamanzi E, Pauwels P, Gasana M, Vandebriel G, Struelens M, Portaels F. Résistance primaire et acquise des souches de Mycobacterium tuberculosis isolées au Rwanda. *Med Trop* 2007; 67: 149-53.
28. Ramarokoto H, Ratsirahonana O, Soares J L, Ravaosolo J, Ravololonandriana P, Rakotoarisaonina A, Ranjalaha G, Ranai-vohajaina S, Mosa M, Robinson R, Ratsitorahina M, Rasolofo V, Rarivoson B. Première enquête nationale sur la résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux à Madagascar, 2005-2006. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 745-50.
29. Chonde TM, Barsa D, Mfi nanga SGM, Range N, Lwilla F, Shirima RP, van Deun A, Zignol M, Cobelens FG, Egwaga SM, van Leth F. Etude nationale de la résistance aux médicaments antituberculeux en Tanzanie. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 967-72.
30. Ngangro NN, Ngarhounoum D, Ngangro MN, Rangar N, Halley des Fontaines V, Chauvin P. Évaluation des facteurs associés aux abandons du traitement antituberculeux au Tchad. *Med Sante Trop* 2013; 23: 60-5.