

## BACTERIOLOGIE

### GENETIQUE DES SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN COTE D'IVOIRE : RÉSULTATS DE LA RÉGION DES LAGUNES

N'GUESSAN Kouassi<sup>1</sup>, EKAZA Euloge<sup>2</sup>, AKA N'guetta<sup>1</sup>, NAHOUA Iremine<sup>3</sup>, BAUDRYARD A, ASSANDE J.M<sup>1</sup>, MOHOUI P, KOUAKOU Jacquemin<sup>3</sup>, DOSSO Mireille<sup>1</sup>

#### RESUME

*Mycobacterium tuberculosis* pathogène strict de l'homme contamine chaque année un tiers de la population mondiale. Le péril que constitue la tuberculose en santé publique incite à explorer les bacilles du complexe tuberculeux particulièrement *Mycobacterium tuberculosis*.

Cette étude avait pour objectif la caractérisation moléculaire de souches *Mycobacterium tuberculosis* excrétées par des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive diagnostiqués dans le district d'Abidjan.

A partir d'un échantillon de 18 souches *Mycobacterium tuberculosis* ont été réalisés un typage par MIRU et un séquençage des gènes *KatG*, l'opéron *mabA-inhA* et son promoteur codant pour la résistance à l'Isoniazide et le gène *rpoB* pour la résistance à la

Rifampicine. Une mutation Asp516→Val dans le gène *rpoB* associée à une mutation Ser315→Thr dans le gène *katG* avait été identifiée chez 3 des 7 souches multi-résistantes.

Les souches typées se répartissent en 3 clusters C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> composés respectivement de 4, 2 et 4 souches et un groupe D comprenant 8 souches dont le profil MIRU était différent les uns des autres.

Sur la base du profil MIRU et des mécanismes de résistance étudiés les souches de *Mycobacterium tuberculosis* excrétées par les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive diagnostiqués dans le district d'Abidjan semblent hétérogènes

**MOTS-CLÉS:** MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS GÈNE DE RÉSISTANCE TYPAGE MOLÉCULAIRE

#### SUMMARY

*Mycobacterium tuberculosis* is a strict Human pathogens it infects one third of human population. In public health tuberculosis constitutes a peril and lead to explore species of *mycobacterium tuberculosis* complex notably *Mycobacterium tuberculosis*.

This study objective was molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from new tuberculosis cases diagnosed in Abidjan District.

A Molecular typing by MIRU and a sequencing of genes involved in resistance to Isoniazid (*katG* gene, operon *mabA-inhA* and its promoter) and Rifampin (*rpoB* gene) were performed on 18 *Mycobacterium tuberculosis* strains.

A mutation Asp516→Val in 515-520 in *rpoB* gene associated to a *katG* Ser315→Thr has been identified in 3 of 7 *Mycobacterium tuberculosis* multidrug strains.

Three clusters C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> respectively with 4, 2 and 4 strains and a group D have been identified. MIRU profile in group D composed by eight strains was unique in each case.

According to MIRU profile and mechanism of resistance studied *Mycobacterium tuberculosis* strains obtained from tuberculosis new cases diagnosed in the District of Abidjan were heterogeneous.

**KEYS WORDS :** MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS GENE OF RESISTANCE MOLECULAR TYPING

---

1- Unité des Mycobactéries Tuberculeuses et Atypiques, Département de Bactériologie-Virologie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan  
2- Unité de Biologie Moléculaire, Département de Bactériologie-Virologie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan  
3- Programme National de Lutte contre la Tuberculose, Abidjan, Côte d'Ivoire  
Tel : 225 22 48 53 63 / Fax : 225 22 48 53 63  
E mail: ngueskr@yahoo.fr

## INTRODUCTION

*Mycobacterium tuberculosis* est juste titre considéré comme l'un des pathogènes humains à succès dans la mesure où le bacille infecte un tiers des habitants de la planète et en tue environ 3 millions chaque année<sup>7</sup>. Bien que la structure de la population de *Mycobacterium tuberculosis* paraît clonale<sup>1,11,13,16</sup> différentes familles ont cependant été identifiées<sup>14,19</sup>. Certaines familles semblent circonscrites à aires géographiques et d'autres largement diffusées au sein des populations humaines<sup>2,19</sup>. Le péril que constitue la tuberculose en santé publique a sans aucun doute contribué au développement de méthodes capables d'identifier les mécanismes de résistance, les liens génétiques entre les souches avec une attention soutenue pour les souches responsables d'épidémie, résistantes ou d'infection sévère.

Pays d'endémie tuberculeuse avec un taux de résistance primaire de tuberculose à bacilles multi-résistants estimée à 5,3% en 1995<sup>6</sup>, les études de génétique des populations de bacilles isolées dans les cas de tuberculose actives y sont presque inexistantes.

Cette étude initiale de la génétique des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* isolées en Côte d'Ivoire a porté sur un échantillon de 18 souches de *Mycobacterium tuberculosis* tirés au hasard parmi 31 souches obtenues à partir des expectorations de nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive nouvellement dépistés dans le district d'Abidjan.

Elle avait pour but de caractériser les souches *Mycobacterium tuberculosis* suivant les mécanismes de résistance identifiés (Isoniazide, Rifampicine) et le profil MIRU des souches étudiées.

## PATIENTS ET METHODES

### PATIENTS ET SOUCHES CLINIQUES

Les souches étudiées ont été obtenues à partir des expectorations de nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive âgés de plus de 15 ans sans distinction de sexe dépistés pendant la deuxième étude de prévalence de la résistance primaire aux antituberculeux de 2004 à 2006. Les expectorations ont été mises en culture sur un milieu de Lowenstein-Jensen après décontamination avec une solution de soude à 4%.

Après une multiplication *in vitro*, sur les caractères morphologiques et culturaux (délai d'apparition des colonies visibles à l'œil supérieur ou inférieur à 7 jours, couleur beige-crème des colonies, colonies d'aspect rugueux ou lisse), un test d'identification (TCH 2µg/ml, Niacin-test, Catalase à 68°, test de la Nitrate reductase) a été réalisé sur les colonies.

Un test de sensibilité aux concentrations de 0.2µg/ml d'Isoniazide, de 40µg/ml de Rifampicine, de 2µg/ml d'Ethambutol et de 4µg/ml Streptomycine a été réalisé selon la méthode des proportions de Canetti et Grosset sur un milieu de Lowenstein-Jensen

sur les isolats appartenant au Complexe *Mycobacterium tuberculosis*<sup>3</sup>.

Deux lectures ont faites au 28<sup>ème</sup> et 42<sup>ème</sup> jour après la réalisation du test en vue de déterminer le taux de mutants résistants à ces antibiotiques.

L'ADN chromosomique des bacilles qui se sont multipliés sur les tubes témoins (dilution 10<sup>-3</sup>) a été extrait par la méthode chimique au phénol-chloroforme<sup>4</sup> et conservé à -80°.

Dans le cadre de l'évaluation des compétences du Centre National de Référence de la Tuberculose sis à l'Institut Pasteur pour la détermination de la sensibilité du bacille tuberculeux à l'Isoniazide et à la Rifampicine un échantillon composé de 24 souches résistantes à l'Isoniazide dont 7 étaient résistantes à la Rifampicine et 7 souches sensibles aux antituberculeux majeurs ont été constitué. A partir de cet échantillon de 31 souches de *Mycobacterium tuberculosis* 18 souches dont 14 étaient résistantes à l'Isoniazide associées ou non à une résistance à la Rifampicine et 4 sensibles tirées au hasard ont été sélectionnées pour cette étude.

### SÉQUENÇAGE DES GÈNES DE RÉSISTANCE À L'ISONIAZIDE ET À LA RIFAMPICINE ET TYPAGE PAR MOLÉCULAIRE

Dans un Mix comprenant 25µl d'eau ; 5µl de tampon PCR 10x ; 5µl de chacun des amorces oligonucléotidiques à 4µM (Tableau I), 5µml de dNTP à 10µM de 0,3µl de Taq polymérase à 5U/µl ont été ajoutés 5µl d'ADN.

Le protocole d'amplification a consisté en une étape initiale de dénaturation de 5min à 95°C, suivie de 35 cycles d'1min à 95°C ; d'1min à 63°C et d'1min à 72°C. La phase finale d'élongation était 7min à 72°C. 5µl de chaque réaction de séquence est déposé dans un puits creusé dans un gel d'agarose à 1% contenant de Bromure d'éthidium à la concentration finale de  $5.10^{-4}$ µg/ml. La migration est faite sous un courant de 135 Volts pendant 15min Après visualisation de l'ADN amplifié à l'aide d'un transilluminateur à UV, le volume total de l'ADN amplifié est déposé dans un concentrateur microcon 100 (Amicon; Inc., Beverly, Mass) puis centrifugé à 2200rpm pendant 15min. Sur l'ADN concentré on ajoute 30µl d'eau. Après 15min, l'ADN est récupéré par une courte centrifugation de 8min à 4300 rpm.

Pour chacune des amorces (Tableau I), un Mix de 7,4µl contenant 0,8µl de Big Dye (Applied Biosystems Inc., Foster city, Calif.) de 2µl de MgCl<sub>2</sub> (5X) et de 4,6µl d'eau est préparé. On ajoute 0,6µl d'une amorce dans

le mix et 2µl d'ADN purifié pour un volume final de 10µl. Le protocole d'amplification a consisté en 25 cycles composés d'une étape de 96°C pendant 10 sec, de 50°C pendant 5secondes et de 60°C pendant 4min.

Après avoir adapté une plaque de récupération sur une microplaque à fond filtrant de 0,45µm (plaque MAHV N45 millipore), 250µl de séphadex G50 (Amersham Pharmacia biotech) ont été distribués dans les puits suivi d'une centrifugation à 2690 rpm pendant 3min. A nouveau; 250µl de séphadex G50 ont été ajoutés dans les précédents puits. Au milieu de chaque puits a été déposé 20µl du produit de la réaction de séquence.

Après avoir changé la plaque de récupération la préparation est de nouveau centrifugé à 2605 rpm pendant 5min puis 38µl d'eau ont été ajoutés aux 2µl de réactions de séquence. La plaque contenant les échantillons est installée dans l'analyseur ABI prism 310 DNA (Applied Biosystems)

Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences disponibles pour le gène *katG* (GeneBank accession numbers X68081), l'opéron *mabA-inhA* et son promoteur (GeneBank accession numbers U66801 and U02492) le gène *rpoB* (GeneBank accession numbers U12205).

Un typage moléculaire par MIRU à l'aide de 12 loci a été réalisé<sup>15,17</sup>. Les Amorces oligonucléotidiques utilisées figurent dans le Tableau II.

## RESULTATS

Trois des 7 souches de *Mycobacterium tuberculosis* qui étaient simultanément résistantes à 0.2µg/ml d'Isoniazide et à 40µg/ml de Rifampicine avaient un mécanisme de résistance identique. Il s'agissait d'une mutation Asp516→Val dans la région 515-520 du gène *rpoB* associée à une mutation Ser315→Thr dans le gène *katG*. Deux des 7 souches mono-résistantes à l'Isoniazide avaient une mutation -15 c→T dans le promoteur *mabA-inhA*. Une parmi elles, avait une mutation Ser315→Thr dans le gène *katG* et une autre en position -8c→A dans le promoteur *mabA-inhA* (Tableau III).

Le typage moléculaire des 18 souches de *Mycobacterium tuberculosis* excrétées par les patients a permis d'identifier 3 clusters C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> composés respectivement de 4, 2 et 4 souches et un groupe D comprenant 8 souches dont le profil MIRU était différent les uns des autres. Dans un même cluster les souches n'avaient pas le même de mécanisme de résistance à l'Isoniazide ou à la Rifampicine (Tableau III).

Dans le cluster C<sub>3</sub>, 3 des 4 souches étaient des souches multi-résistantes dont 2 avaient un mécanisme de résistance identique (Tableau III).

Les souches regroupées dans les clusters sont circonscrites à la zone située au nord d'Abidjan et celles du groupe D paraissent

largement disséminées dans le district d'Abidjan.

## DISCUSSION

Dix-huit souches excrétées par les cas nouveaux de tuberculose pulmonaire à microscopie positive ne semblent pas assez être représentatives des souches de *Mycobacterium tuberculosis* excrétées par les nouveaux malades dépistés en Côte d'Ivoire qui de plus est un pays d'endémie tuberculeuse.

Ce faible échantillonnage répondait avant tout à des objectifs de transfert de technologie au sein de notre établissement pour le typage des bacilles par une méthode robuste et accessible<sup>15,17</sup>. Cet échantillon a été extrait d'un échantillon initialement destiné à l'évaluation des compétences du laboratoire de la tuberculose d'Abidjan pour la mesure de la sensibilité des bacilles tuberculeux aux drogues majeurs que sont la Rifampicine et l'Isoniazide expliquant en partie un nombre élevé de souches *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à ces médicaments.

Ces résultats préliminaires de l'étude de la génétique des populations de bacilles isolés en Côte d'Ivoire font apparaître que dans les 10 communes du District d'Abidjan sur la base du profil MIRU et des mécanismes de résistance étudiés les souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées des expectorations seraient hétérogènes.

L'étude du polymorphisme génétique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* réalisée au Cameroun et au Burkina, pays d'endémie tuberculose ont montré que les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* étaient hétérogènes<sup>9,12</sup>.

Dans ce cadre de cette étude, la diversité génétique a permis d'identifier 3 clusters apparemment circonscrits à la zone située au nord du District d'Abidjan. Cette zone est constituée des communes d'Abobo, de Yopougon, d'Attécoubé et d'Adjamé.

Si l'on admet l'hypothèse que les souches d'un même cluster sont identiques entre elles sur base du profil MIRU dans un contexte endémique<sup>10</sup>. Il revient alors d'entrevoir deux observations; la première porte sur l'existence de bacilles sensibles et résistants au sein d'un cluster ou les bacilles sont a priori identiques entre eux. Les différences observées dans ce cas de figure, tant au niveau des mécanismes de résistance identifiés et du phénotype de résistance cadrent bien avec le phénomène de l'hétérorésistance des populations de bacilles<sup>8</sup> et de l'émergence de bacilles résistants sélectionnés par un traitement antituberculeux inapproprié<sup>5</sup>; la seconde, considérant l'existence ou non d'un mécanisme de résistance laisse entrevoir la possibilité de deux cas de transmission inter-humaine de tuberculose à partir de deux bacilles différents. Il s'agissait d'un cas de tuberculose pulmonaire à bacilles sensibles et l'autre à bacilles résistants.

Dans ce cas de figure, la voie de dissémination des bacilles par voie aérienne est à privilégier comme principale source de propagation de bacilles surtout que les patients semblent appartenir à la même aire géographique.

Dans la mesure où les liens épidémiologiques entre ces cas de tuberculose précédemment mentionnés ne sont pas clairement établis, une étude du Polymorphisme des Fragments de Restriction (RFLP IS 6110) s'impose pour renseigner au mieux ces cas<sup>18</sup>.

Au terme de cette analyse, les résultats incitent à davantage sensibiliser les acteurs sanitaires sur la qualité de la prise en charge des tuberculeux dont le traitement adéquat et bien conduit réduit les risques d'émergence et de propagation de tuberculose à bacilles résistants.

## CONCLUSION

Les souches de *Mycobacterium tuberculosis* excrétées par les malades nouvellement dépistés semblent hétérogènes sur la base du profil MIRU et les mécanismes de résistance.

## REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements au Professeur, Vincent JARLIER Wladimir SOUGAKOFF (Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière et du Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance aux Antituberculeux qui nous a accepté dans son service, CHU Pitié-Salpêtrière de Paris).

Lionel DEFORGES (Hôpital Henri MONDOR, Laboratoire de recherche des bactéries pathogènes spécifiques, Laboratoire associé du CNR) pour leurs appuis techniques et scientifiques. Nos remerciements au Comité National Anti-tuberculeux de Côte d'Ivoire pour son assistance financière.

## REFERENCES

- 1- Allan D, Whittam T S, Murray M B, Cave M D, Hazbon M H, Dix K, Kokoris , Duesterhoft A, Dueshoeft A, Eisen J A, Fraser and Fleischmann. Modeling bacterial evolution with comparative genome based marker system: application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. J. Bacteriol. 2003; 185:3392-3399
- 2- Bifani P, Mathema J P, Kurepina N E and Kreiswirth. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. Trends Microbiol. 2002, 10:45-52
- 3- Canetti, G., Rist, N. and Grosset J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibiologic drugs by the method of proportions. Methodology, resistance, criteria results and interpretation. Rev. Tuberc. Pneumol. 1963; 27: 217-272
- 4- Chomczynski, P. A reagent for a single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissues samples. Bio techniques. 1993. 15:532-537
- 5- Cohen T., Becerra M. C., and Murray M B. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. Microbial Drug Resistance. 2004. 4: 280-284.
- 6- Dosso M., Bonnard D, Msellati P., Douhourou C. Bamba A., Peyre M., Traoré M., Koffi K., Vincent V., Trebucq A., Boulahbal F., Coulibaly I. M.. Surveillance des résistances secondaires aux anti-tuberculeux en Côte d'Ivoire 1995-1996. Tubercle and Lung Disease 1996, 77:65-69
- 7- Dye C; Scheele S; Dolin P, Pathania V; Raviglione M: C and al. Consensus statement: global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. JAMA. 1999;282:677-686.
- 8- Gillespie S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. Antimicrob. Agents Chemother. 2002. 46:267-274
- 9- Godreuil S, Torrea G, Terru G et al. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina faso. J Clin Microbiol 2006;45,921-927
- 10- Mazars E; Lesjean S, Banuls A L, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B; Tibayrenc M; Loch C, Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology: PNAS; 98:1901-1906
- 11- Musser J. M, Amin M A and Ramaswamy. Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. Genetics. 2000, 155:7-16
- 12- Sara Ngo Niobe-Eyangoh, Christopher Kuaban, Philippe Sorlin, Jocelyn Thonnon, Veronique Vincent And Cristina Gutierrez. Molecular characteristics of strains of the Cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. J Clin Microbiol 2004, 42, 5029-5035

13. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer K, Connel N, Kreiswirth B, Whittam and Musser J.M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. Proc Natl. Acad. Sci. 1997;97:9869-9874
14. Sola C, Filliol I, Legrand E, Mokrousov and Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. J. Mol. Evol. 2001;53:680-689.
15. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol Microbiol. 1997; 26:991-1003
16. 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; 36:762-71
17. Supply P, Warren R. M, Banuls A. L, Lesjean S, Van Der Spyu G. D, Lewis L.A, Tibayrenc M, Van Helen P.D and Locht C. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. Mol Microbiol. 2003. 47:529-538
18. Van Embden J:D, Cave M. D, Crawford J. T, Dale J. W, Eisenach K. D, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick T. M et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standized methodology. J. Clin. Microbiol. 31: 406-409.
19. Van Soolingen, D., Qian D. L, De Haas P. E, Douglas J. T, Traore H, Poortaels F, Quing Z, Enkhasaikhan D, Nymadawa P and Van Embden D.A. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J. Clin . Microbiol.33:3234-3238

**Tableau I:** Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les réactions d'amplification des gènes de résistance

Cibles	Désignation	séquence oligonucléotidique (5' - 3')	Segment amplifié (bp)	Hybridization (°C)
rpoB	rifip1	GGT CGG CAT GTC GCG GAT GG	257	63
	ripip2	CGA CGT CGC GGA CCT CCA GC		
katG	katA	CCC GAT AAC ACC TCC TG	817	59
	katCas	GTT TCG ACG TCG TTC ATG GC		
	kat2	CTC GGC GAT GAG CGT TAC AG		
	kat4as	CCA GCG GTA AGC GCT TGT AG	1,318	59
	katC	CCG AGT ACA TGC TGC TCG AC	609	59
	katEas	GGT GAT CGC ACA TCC AGC AC		
Operon mabA- inhA et son promoteur	Pro1	TCA ATA CAG CCG CAG CCA	493	53
	Pro2	GTC ATC CGC ATG AGG AAT		
	FabG1	TCA CGG CGG TAG AAG AGC	553	53
	FabG2	CAT GTG CGT CCT TGT GTT		
	INH A1	AGG ACG CAC ATG ACA AGC		
	INH A2	TCA TGA TCG GCA GCA GCG	412	53
	INH A3	CCA CAT CTC GGC GTA TTC	601	53
	INHAD	CGA AAT GCA GGT AGT GCT C		

**Tableau II.** Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les réactions d'amplification du typage par MIRU

MIRU	Amorces		Température d'hybridation (°C)
MIRU 2	sens	5'TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT 3'	59
	antisens	5'TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT 3'	
MIRU 4	sens	5'GCGCGAGAGCCCGAAC TGC 3'	59
	antisens	5'GCGCAGCAGAAACGTCAGC 3'	
MIRU 10	sens	5'GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC 3'	59
	antisens	5'GCGCAGCAGAAACGTCAGC 3'	
MIRU 16	sens	5'TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA 3'	59
	antisens	5'CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC 3'	
MIRU 20	sens	5'TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG 3'	59
	antisens	5'GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA 3'	
MIRU 23	sens	5'CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG 3'	59
	antisens	5'GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA 3'	
MIRU 24	sens	5'CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT 3'	59
	antisens	5'GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA 3'	
MIRU 26	sens	5'TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGGAC 3'	59
	antisens	5'CATAGGCGACCAGGCGAATAG 3'	
MIRU 27	sens	5'TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA 3'	59

**Tableau II:** Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les réactions d'amplification du typage par MIRU

	antisens 5'	GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA 3'	
MIRU 31	sens 5'	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA 3'	59
MIRU 39	sens	5'CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC 3'	59
	antisens	5'CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT 3'	
MIRU 40	sens 5'	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT 3'	59
	antisens	5'GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA 3'	

**Tableau III:** Profil MIRU, mécanismes de résistance et la résidence des patients

Résidence	Multi-résistants (Rif 40µg/ml ; Inh 0.2µg/ml) n=7					Mono-résistants à l'INH (Rif 40µg/ml ; Inh 0.2µg/ml) n= 7			Sensibles (Rif 40µg/ml ; Inh 0.2µg/ml) n= 4
	Mécanismes					Mécanismes			Mécanismes
	M <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	M <sup>4</sup>	M <sup>5</sup>	I <sup>1</sup>	I <sup>2</sup>	I <sup>3</sup>	S
Abobo	1(C <sub>3</sub> )	1(C <sub>1</sub> )	-	-	-	1(D)	-	1(C <sub>1</sub> )	1(D) 1(C <sub>2</sub> )
Adjamé	1(C <sub>3</sub> )	-	1(C <sub>3</sub> )	1(D)	-	1(C <sub>3</sub> )	-	-	-
Attécoubé	-	-	-	-	-	-	-	-	1(C <sub>1</sub> )
Youpougon	1(D)	-	-	-	-	-	1(D)	-	1(C <sub>1</sub> )
Dioulakro	-	-	-	-	1(C <sub>2</sub> )	-	-	-	-
Koumassi	-	-	-	-	-	-	-	1(D)	-
Koffikro	-	-	-	-	-	1(D)	-	-	-
Treichville	-	-	-	-	-	-	1(D)	-	-

M<sup>1</sup> = D516V+S315T M<sup>2</sup> = S513L+-15c>T M<sup>3</sup> = S522L+H526R+S315T M<sup>4</sup> = Délétion 313-315 + S315T M<sup>5</sup> = H536Y+S315T+-8t>C I<sup>1</sup> = S315T I<sup>2</sup> = S315T+-8t>A  
I<sup>3</sup> = -15c>T S = wild type Rif= Rifampicine Inh= Isoniazide C<sub>1</sub> = Cluster 1 C<sub>2</sub> = Cluster 2 C<sub>3</sub> = Cluster 3 D= Profils MIRU différents