

INTERET ET LIMITES DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES ISOLATS. EXEMPLE DE LA TUBERCULOSE*

Nadia Haddad¹ et B. Durand²

RESUME : Dans le cas de la tuberculose, les outils de la biologie moléculaire, jusqu'alors quasiment absents, se sont considérablement développés au cours de la dernière décennie, à des fins diagnostiques ou de typage. Il s'agit essentiellement de techniques de RFLP et d'une technique originale, le spoligotyping. D'autres donnent des résultats prometteurs, comme le typage des VNTR, et les puces à ADN devraient bientôt émerger. Ces techniques rendent de grands services en épidémiologie, aidant par exemple à « tracer » des infections (enquêtes en amont et en aval), ou à identifier chez l'homme la nature épidémique de la propagation de certains isolats. Cependant, pour maîtriser ces outils et les utiliser de façon optimale, il est important de connaître aussi bien que possible certaines propriétés des zones génétiques concernées, en particulier leur stabilité et leur polymorphisme. Il en résulte aussi que l'interprétation des résultats obtenus à l'aide de ces outils doit toujours être prudente et raisonnée, en adéquation étroite avec les informations épidémiologiques fournies par les enquêtes de terrain.

Cet article vise donc, après avoir décrit ces techniques, à proposer quelques clés d'utilisation et d'interprétation des techniques de biologie moléculaire appliquées à l'épidémiologie de la tuberculose.

SUMMARY : In the case of tuberculosis, molecular biology tools have appeared rather recently, with a dramatic development during the last decade.

The main techniques used are RFLP techniques and an original technique, spoligotyping. Others give promising results like VNTR typing, and DNA microarrays techniques should emerge soon.

These techniques, which are used for diagnosis or typing purposes, are very precious in the field of epidemiology. For instance, they help to « trace » infections (up and down investigations) or to identify the epidemic dynamic of propagation of certain isolates.

But, in order to control these tools and use them optimally, it is important to know as far as possible some of the properties of the genetic regions which are involved, particularly their stability and their polymorphism. As a consequence, the interpretation of the results obtained with these tools should always be cautious and reasoned, in straight consistency with the epidemiological information provided from the investigations on the field.

The aim of this paper is then to propose, after a short description of the techniques, some keys for the use and interpretation of molecular biology techniques applied to the epidemiology of tuberculosis.



* Texte de l'exposé présenté lors de la Journée AEEMA, 17 mai 2001

¹ ENVA - Unité pédagogique Maladies Contagieuses, 94704 Maisons-Alfort, France

² Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA). Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses (LERPAZ), 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort, France

La tuberculose demeure l'un des grands fléaux de l'humanité et de l'élevage dans le monde. S'agissant d'une zoonose majeure, son éradication constitue en médecine vétérinaire à la fois un enjeu économique et un enjeu de santé publique. En France, la lutte contre la tuberculose animale commence à porter ses fruits, puisque le taux de prévalence de l'infection des cheptels a chuté suffisamment depuis 6 ans (< 0,01%) [Anonyme, 2000a] pour que la France soit déclarée depuis janvier 2001 « pays officiellement indemne de tuberculose » [Anonyme, 2000b]. Cependant, cela ne signifie pas que la tuberculose a disparu du territoire français. Il convient au contraire d'être particulièrement vigilant à ce stade. En effet, la détection des cas résiduels est rendue particulièrement

difficile car les outils classiques de dépistage (comme l'IDS) ne sont plus adaptés. D'autre part, d'autres menaces, comme l'apparition d'un réservoir sauvage, ne sont pas à exclure. De nouveaux outils d'investigation épidémiologique sont donc particulièrement requis, en même temps que sont mis en place un réseau national d'épidémiosurveillance et une nouvelle stratégie réglementaire basée sur la maîtrise des facteurs de risque [Bénet, 2001]. Dans ce cadre, les mycobactéries sont une illustration très intéressante de l'apport considérable de la biologie moléculaire à l'épidémiologie, en même temps que de la nécessaire prudence à apporter à la signification et à l'interprétation des résultats.

I - LES MYCOBACTERIES AGENTS DE TUBERCULOSE ET TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Nous n'évoquerons que les bactéries appartenant au « complexe tuberculosis », qui regroupe tous les agents de tuberculose sauf *M. avium*, agent de la tuberculose aviaire. Ce complexe comporte un nombre croissant de membres dont certains sont encore candidats (encadré 1), et qui sont en fait autant de sous-espèces, du fait de la très grande homogénéité du groupe sur le plan génétique.

Il contient en particulier *M. tuberculosis*, agent principal de la tuberculose humaine, et *M. bovis*, agent principal de la tuberculose des ruminants, mais pathogène pour de nombreuses autres espèces, dont l'homme.

ENCADRE 1

Le « Complexe tuberculosis »

Une espèce génomique : *M. tuberculosis*

Différentes sous-espèces génomiques :

- *tuberculosis*
- *bovis*
- *bovis* BCG
- *africanum*
- *microti*
- *canetti* ? [van Soolingen *et al.*, 1997]
- *caprae* ? [Aranaz *et al.*, 1999]

L'intérêt de la proximité génétique de ces bactéries est qu'une technique utilisable pour l'une sera aussi utilisable pour l'autre.

De façon générale et par comparaison avec la plupart des autres bactéries, le génome des mycobactéries est

riche en GC (GC% \approx 65%) et étonnamment peu polymorphe par rapport à sa taille (4,4 Mb). Cela serait le reflet d'une évolution récente de ce génome [Sreevatsan *et al.*, 1997]. Les zones de plus grand polymorphisme semblent se localiser essentiellement dans deux types de structures génétiques :

- d'une part, des segments de gènes codant pour des protéines dont la variabilité est susceptible d'apporter un avantage sélectif aux bactéries (gènes de résistance aux anti-tuberculeux, gènes codant pour des protéines antigéniques impliquées dans l'échappement à la réponse immunitaire,...) ;
- d'autre part, des séquences non codantes, comme des séquences d'insertion ou des séquences répétitives.

Ces structures plus polymorphes sont directement concernées par les techniques de typage, puisque dans le cas des mycobactéries du complexe tuberculosis, l'étude moléculaire des isolats fait essentiellement appel à la caractérisation de cibles spécifiques. De découverte récente, elles correspondent à :

- des séquences d'insertion, en particulier l'IS6110 [Thierry *et al.*, 1990]
- des séquences répétitives, en particulier trois d'entre elles :
 - la région DR pour « Direct Repeats », c'est-à-dire « Séquences répétées directes » [Hermans *et al.*, 1991 ; Groenen *et al.*, 1993] ;
 - les PGRS, pour « Poly GC Rich Sequences », c'est-à-dire « Séquences riches en GC », ce taux étant d'environ 80% [Ross *et al.*, 1992]. Ces zones appartiennent à des gènes codant pour des protéines, les protéines PE, qui sont impliquées,

2000 ; Viana-Niero *et al.*, 2001]. Cela est d'autant plus intéressant que cette technique peut potentiellement être mise en œuvre sur des prélèvements pathologiques, sans nécessiter l'isolement de la mycobactérie en cause [Qian *et al.*, 1999 ; Roring *et al.*, 2000].

La figure 2 montre des exemples de profils (spoligotypes) d'isolats de *M. bovis*. A gauche (figure 2a), ils proviennent de France [Haddad *et al.*, 1999], à droite (figure 2b) du Cameroun [Njanpop-Lafourcade *et al.*, 2001].

On peut constater dès à présent que les isolats du Cameroun semblent présenter une signature : l'absence du « spacer » 30.

Bien entendu, il existe d'autres techniques qui ne seront pas évoquées ici, faute de temps ou d'intérêt (électrophorèse en champ pulsé, RAPD, PCR-IS6110,...).

Il est en revanche important, avant d'aborder des exemples d'applications de ces techniques, de s'interroger sur les limites qu'elles présentent et sur les moyens permettant d'aboutir malgré tout à des conclusions exploitables à des fins épidémiologiques.

FIGURE 2

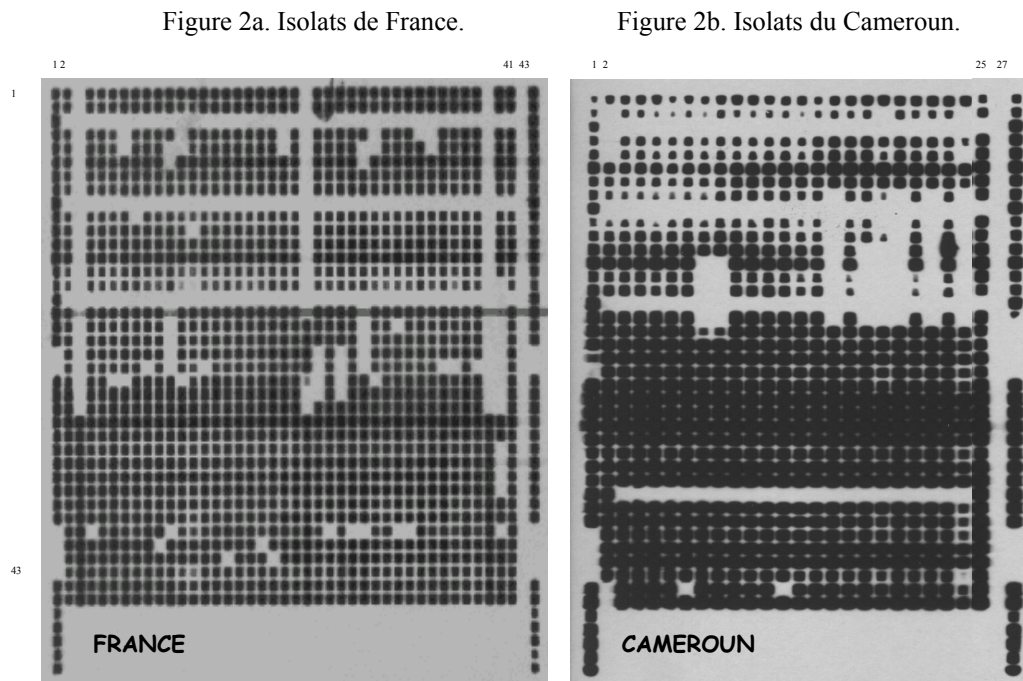
Exemples de spoligotypes obtenus en France et au Cameroun

Chiffres verticaux : « Spacers » 1 à 43.

Chiffres horizontaux :

Figure 2a. 1 et 43 : souches de *M. tuberculosis*. 2. Souche de *M. bovis* BCG. 3 à 41 : isolats de *M. bovis* de France.

Figure 2b. 1 et 27 : souches de *M. tuberculosis*. 2 à 25 : isolats de *M. bovis* du Cameroun.



II - POLYMORPHISME ET STABILITE DES MARQUEURS

Les deux éléments qu'il est particulièrement crucial de maîtriser le mieux possible si on veut exploiter une technique moléculaire sont le polymorphisme et la stabilité du(des) marqueur(s).

1. POLYMORPHISME (tableaux Ia et Ib).

En matière de polymorphisme, les éléments dont on dispose concernant les agents de la tuberculose peuvent

se résumer de la façon suivante. Le polymorphisme va dépendre :

1.1. DE LA SOUS-ESPECE DE MYCOBACTERIE

Le cas de l'IS6110 est particulièrement illustratif de l'action de ce facteur au sein du complexe tuberculis.

- En effet, le nombre de copies de cette séquence d'insertion (IS) est en général assez élevé chez *M. tuberculosis*, pouvant aller jusqu'à 25 [Devallois *et*

al., 1998], ce qui donne en général un bon pouvoir de discrimination à la technique [Goyal *et al.*, 1999 ; Horgen *et al.*, 1998 ; Sola *et al.*, 1998]. Mais il existe des isolats à faible nombre de copies [Bauer *et al.*, 1999 ; Goyal *et al.*, 1997. Yang *et al.*, 2000], et même des isolats dépourvus de cette IS au Vietnam [Yuen *et al.*, 1993].

- A l'inverse, la majorité des isolats de *M. bovis* ont un faible nombre de copies, le plus souvent égal à un [Aranaz *et al.*, 1996 ; 1998 ; Cousins *et al.*, 1999 ; Kamerbeek *et al.*, 1997 ; Kremer *et al.*, 1999 ; Serraino *et al.*, 1999], avec un maximum de huit [Devallois *et al.*, 1998].

C'est pourquoi, la technique de RFLP-*IS6110* est la technique de référence pour *M. tuberculosis* alors qu'elle offre peu d'intérêt pour la majorité des isolats de *M. bovis*.

1.2. DU MARQUEUR LUI-MEME, CHEZ UNE SOUS-ESPECE DONNEE

Ainsi, chez la plupart des souches de *M. bovis*, sauf celles issues de certaines espèces comme l'espèce caprine, les séquences PGRS sont plus polymorphes que les régions DR, elles-mêmes plus polymorphes que l'*IS6110* (en terme de nombre de copies) [Cousins *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 2000 ; Zumarraga *et al.*, 1999].

1.3. DE L'ESPECE ANIMALE

Comme cela vient d'être évoqué, le nombre de copies de l'*IS6110* chez les *M. bovis* isolés de bovins est en général faible. A l'inverse, des isolats issus d'animaux sauvages [van Soolingen *et al.*, 1994], ou de caprins et de bovins d'Espagne [Gutierrez *et al.*, 1995] possèdent un nombre élevé de copies.

1.4. DE LA ZONE GEOGRAPHIQUE

Ainsi, le statut insulaire et celui de pays à taux de prévalence élevé de tuberculose bovine semblent associés à un plus faible polymorphisme du fait de la dominance d'un clone, qu'il s'agisse de *M. bovis* [Clifton-Hadley *et al.*, 1998 ; Costello *et al.*, 1999 ; Durr *et al.*, 2000b ; Njanpop-Lafourcade *et al.*, 2001] ou de *M. tuberculosis* [Qian *et al.*, 1999, Yuen *et al.*, 1993].

1.5. DU NOMBRE DE MARQUEURS INDEPENDANTS UTILISES

Bien évidemment, comme cela a déjà été souligné, plus on utilisera de marqueurs indépendants, c'est-à-dire correspondant à des zones génétiques évoluant indépendamment les une des autres, plus on aura de chances de révéler un degré plus élevé de polymorphisme **entre isolats** (dernière colonne du tableau Ia).

TABLEAU Ia
 Polymorphisme des marqueurs chez *M. bovis*

Auteurs	Nombre d'isolats	RFLP- IS6110	RFLP- DR	RFLP- PGRS	Spoligo- typage	Autres	Combinaison
Aranaz <i>et al.</i> , 1998	128	25	17	28	19		46
Cousins <i>et al.</i> , 1999	45	14	22	32	18		41
Gutierrez <i>et al.</i> , 1995	CV : 10 BV : 17	6 4	5 7	3 6			? 7
Njanpop-Lafourcade <i>et al.</i> , 2001	62				9	4 (ECP)	22
Zumarraga <i>et al.</i> , 1999	154		42	42	31		88

CV = isolats de chèvres ; BV = isolats de bovins ; ECP = électrophorèse en champ pulsé.

En **gras** : marqueur le plus polymorphe dans l'étude.

En *italiques* : cas où la combinaison de marqueurs indépendants augmente le polymorphisme.

TABLEAU Ib
 Polymorphisme des marqueurs chez *M. tuberculosis*

Auteurs	Nombre d'isolats	RFLP- IS6110	RFLP- DR	RFLP- PGRS	Spoligo- typage	VNTR
Goyal <i>et al.</i> , 1997	184	125			88	
Kremer <i>et al.</i> , 1999	90	84	63	70	61	56
Sola <i>et al.</i> , 1999	113	59	32		43	
Yang <i>et al.</i> , 2000	88*	34		68	40	

En **gras** : marqueur le plus polymorphe dans l'étude. * Isolats à faible nombre de copies de l'*IS6110*.

2. STABILITE

Comme cela a été souligné, la stabilité de la zone génomique correspondant au marqueur est très importante à connaître, un certain degré de stabilité ou au contraire de variabilité pouvant être déterminant par rapport aux objectifs que l'on s'est fixés.

Cette composante n'est pas forcément facile à appréhender car elle rend nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires qui aboutissent aux modifications que l'on observe, et d'en déterminer la cinétique (notion « d'horloge moléculaire »), ce qui exige d'avoir un minimum de recul dans le temps.

En pratique pour les zones qui nous intéressent, on peut considérer aujourd'hui que :

- La stabilité des IS6110 est suffisante par rapport à la réalité épidémiologique s'il y a moins de six copies par génome. C'est donc le cas pour la plupart des isolats de *M. bovis*. Ceci serait lié au fait qu'il y a des « points chauds » d'intégration de l'IS6110 dans le génome, notamment le locus *ipl* (pour IS6110 preferential locus), qui comporte six sites d'intégration de l'IS6110 [Fang *et al.*, 1997], et la région DR [Hermans *et al.*, 1991]. De ce fait, lorsque le nombre de copies de cette IS est inférieur ou égal à six, la fréquence de transposition est faible. A partir de six copies, la stabilité baisse car l'insertion est plus aléatoire. Mais quand le nombre de copies dépasse 12, le profil est à nouveau stable, et on suppose qu'une insertion dans de nouveaux sites serait létale [Yeh *et al.*, 1998]. En pratique, cela signifie concrètement que deux isolats différant pour une copie ne pourront être considérés comme

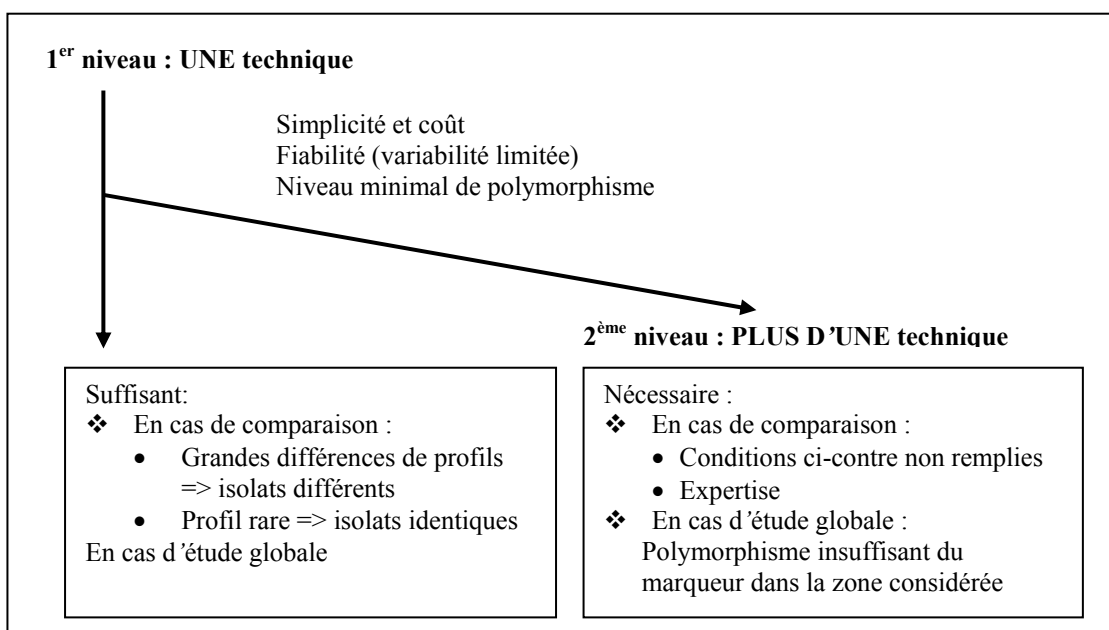
différents, des variations de profil ayant été décrites par plusieurs auteurs, notamment chez des sujets infectés de façon prolongée par une même souche multirésistante de *M. tuberculosis* [Alito *et al.*, 1999 ; Niemann *et al.*, 1999].

- Les trois autres marqueurs (DR, PGRS, VNTR) sont manifestement plus stables que les IS6110, selon les observations concordantes de plusieurs auteurs [Aranaz *et al.*, 1998 ; Filliol *et al.*, 2000 ; Yeh *et al.*, 1998]. Dans le cas de la région DR, la stabilité est avérée par divers exemples relatifs à *M. bovis* [Durr *et al.*, 2000a] et *M. tuberculosis* [Qian *et al.*, 1999]. Taylor *et al.* [1999] ont récemment montré, à partir de prélèvements d'origine médiévale, que les profils s'étaient conservés jusqu'à nos jours, au moins au niveau de la sous-espèce. On sait comment est orientée la micro-évolution de cette région. Elle est en effet toujours unidirectionnelle, et va toujours dans le sens de l'accumulation de délétions (sans réversion possible vers l'acquisition de nouveaux « spacers » ou la réacquisition de « spacers » perdus). Le problème qui reste posé est celui des voies possibles qui sont empruntées pour aboutir à une délétion en bloc, c'est-à-dire en une et/ou plusieurs étapes [Brittain *et al.*, 2000].

Au bilan, pour tenir compte au mieux de ces notions en ce qui concerne les agents de la tuberculose, on peut proposer le protocole suivant, comme le montre l'encadré 3 :

ENCADRE 3

Applications : choix des techniques



Un premier niveau permet de se contenter d'utiliser une seule technique. Les critères de choix seront autant pragmatiques que scientifiques, puisqu'on se basera essentiellement sur la simplicité de réalisation et sur le faible coût de la technique choisie, indépendamment de l'objectif de l'étude. On choisira donc *a priori* :

- pour *M. bovis*, le spoligotypage (sauf cas particuliers, pour lesquels on préférera le RFLP-IS6110)
- pour *M. tuberculosis*, le RFLP- IS6110, sauf cas particulier des isolats de certaines régions, où l'IS6110 est réputée absente ou faiblement représentée, auquel cas on aura recours au spoligotypage.

Ce premier niveau pourra être suffisant si l'on compare des isolats et dans l'hypothèse où pour ce seul marqueur :

- soit des différences majeures de profil permettent de conclure à une différence entre les isolats ;

- soit, à l'inverse, la présence d'un profil rare par rapport aux données dont on dispose permet de conclure à l'identité des isolats.

Ces conclusions supposent bien entendu que les données épidémiologiques soient convergentes avec les résultats.

On pourra aussi se contenter de ce premier niveau dans le cas d'une étude globale, qui ne nécessite pas un grand degré de polymorphisme et est au contraire soustendue par une certaine stabilité dans le temps du marqueur.

Le second niveau fait appel à des techniques additionnelles et sera exigible en cas de comparaison d'isolats, lorsque les conditions évoquée ci-dessus n'ont pas été remplies ou si, d'emblée, on a un objectif d'expertise.

Il pourra également être requis dans le cas d'une étude globale, si le marqueur s'avère trop monomorphe, dans une région donnée ou pour une espèce donnée.

Ces principes vont être illustrés maintenant par la présentation de quelques applications.

III - EXEMPLES D'APPLICATIONS

Il y a donc schématiquement deux grandes catégories d'applications à considérer.

1. COMPARAISON DE DEUX ISOLATS

La comparaison de deux isolats, pour conclure s'ils sont identiques ou différents, peut viser dans le cas de la tuberculose les objectifs suivants :

- déterminer l'origine d'un foyer ;
- rechercher l'existence d'une transmission inter-espèces ;
- démontrer l'existence d'une double infection ou d'une réinfection ;
- démontrer l'existence de contaminations au laboratoire ;

1.1. DETERMINER L'ORIGINE D'UN FOYER

Dans un cheptel, les trois facteurs de risque sont : voisinage, résurgence, introduction d'un animal infecté [Bénet, 2001]. Les trois cas suivants [Haddad *et al.*, 2000] illustrent l'intérêt de la biologie moléculaire pour conforter des hypothèses ou aider à les envisager.

1er cas : voisinage (figure 3a)

Ainsi, dans un département français, s'est posée la question d'éventuelles contaminations de voisinage. Quatre exploitations ont en effet été déclarées infectées dans un intervalle relativement court (fin 98/début 99) dans une zone géographique restreinte. La seule information dont on disposait était que les animaux des fermes A et B étaient pratiquement mufler à mufler, les pâturages se touchant. Ceci laissait supposer l'existence d'un lien épidémiologique entre A et B. En revanche, pour les élevages C et D, il n'y avait pas d'information aussi précise. L'utilisation du spoligotypage a permis :

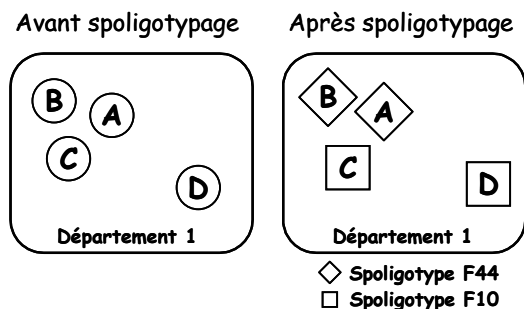
- **de confirmer que les isolats des fermes A et B possédaient le même spoligotype rare F44 ;**
- **de montrer que les isolats des fermes C et D possédaient le même spoligotype rare F10, très différent de celui de F44, ce qui démontre l'existence de deux foyers distincts.**

Cet exemple montre, comment avec une seule technique, on peut conclure à l'identité ou au contraire à la différence de deux isolats.

FIGURE 3a

Intérêt du typage moléculaire pour déterminer l'origine d'un foyer.

Cas de contaminations de voisinage.



2ème cas : résurgence (figure 3b)

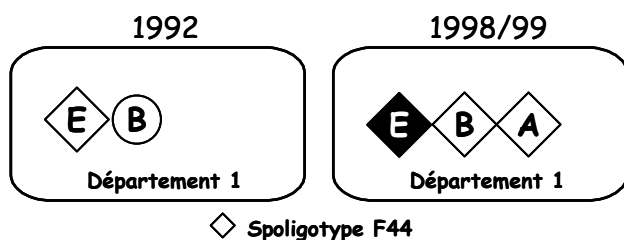
Dans le même département, le spoligotypage a permis d'aller au-delà de ces informations, en révélant l'origine probable du foyer A-B. En effet, en étudiant systématiquement les isolats provenant du département 1, il a été constaté que le spoligotype F44 avait déjà été rencontré, dans un isolat de 1992 de l'élevage E. Or, la DSV du département a révélé qu'en 1992, du fait d'un lien familial, les animaux des élevages B et E partageaient la même pâture, encore dans l'indivision.

L'élevage E a été totalement éliminé fin 1992. Il est donc fort possible que la contamination de l'élevage B ait eu lieu en 1992, et que l'émergence récente de l'infection corresponde donc à une résurgence de fait, avec contamination ultérieure de A, pour lequel aucune autre source de contamination n'a été identifiée.

FIGURE 3b

Intérêt du typage moléculaire pour déterminer l'origine d'un foyer.

Cas probable de résurgence.



3ème cas : introduction (figure 3c)

Enfin, toujours dans le même département, un autre cas pourrait être illustratif de la dernière modalité de contamination, l'introduction d'un animal infecté. En effet, en 1999, le spoligotype F4 est apparu dans le département 1. Or, les données de la DSV ont permis de savoir que l'élevage atteint, F, avait acheté quelques mois auparavant des vaches Salers, dans un élevage G, situé dans le département 2.

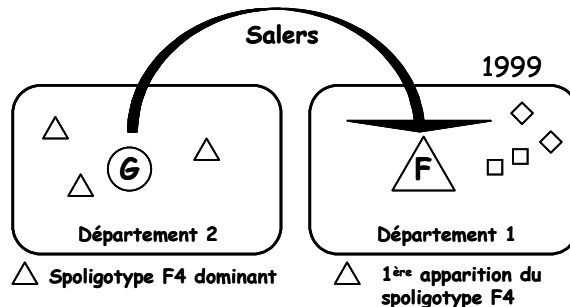
Comme par hasard, le spoligotype dominant dans le département 2 était justement le spoligotype F4.

L'absence d'isolat disponible dans l'élevage G (reconnu entre-temps infecté de tuberculose) n'a pas permis de conforter définitivement cette hypothèse, mais sa plausibilité est rendue beaucoup plus forte du fait des données fournies par le typage.

FIGURE 3c

Intérêt du typage moléculaire pour déterminer l'origine d'un foyer.

Cas probable d'introduction d'un bovin infecté.



1.2. RECHERCHER L'EXISTENCE D'UNE TRANSMISSION INTER-ESPECES

En médecine vétérinaire, et concernant la tuberculose, il peut être important de répondre à des questions concernant l'hypothèse d'une transmission inter-espèces. On peut envisager deux catégories de cas :

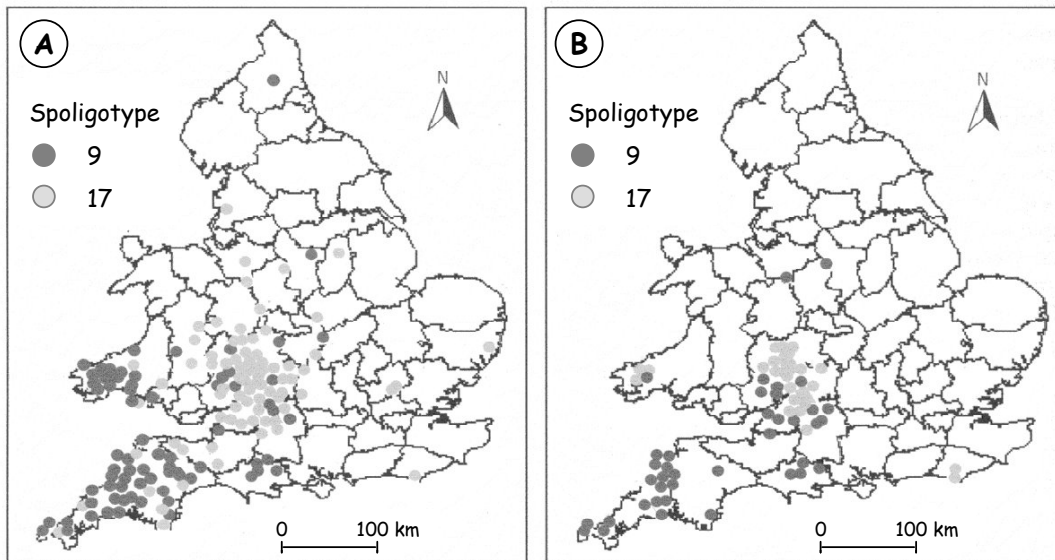
- la transmission inter-animale, qui pose en particulier le problème de l'existence de réservoirs sauvages de *M. bovis* ;
- et, bien sûr, la transmission d'animaux à l'homme, la tuberculose étant une zoonose majeure.

1.1.1. Transmission inter-animale

Le problème de l'existence de réservoirs sauvages de *M. bovis* s'est posé de façon particulièrement criante en Grande-Bretagne, puisque après une réduction très forte de la prévalence de la tuberculose bovine, cette maladie a connu une augmentation explosive, qui n'a pu être maîtrisée depuis, malgré les moyens de lutte utilisés dans les cheptels. Cette incapacité, jointe à la découverte de blaireaux présentant des lésions étendues de tuberculose, a conduit à suspecter que les blaireaux pouvaient constituer dans ce pays le nouveau réservoir de tuberculose. Cette hypothèse a été validée par le fait que dans une même région géographique, **les isolats issus de bovins et de blaireaux ont exactement les mêmes profils avec les quatre techniques utilisées (RFLP-IS6110, RFLP-DR, RFLP-PGRS, spoligotypage)**, dont trois correspondant à des marqueurs indépendants, comme le montre la figure 4, qui présente les résultats obtenus avec le spoligotypage.

FIGURE 4

Distribution des principaux spoligotypes observés au Royaume-Uni en 1996-97 chez les bovins (carte a) et chez les blaireaux (carte b), d'après Durr et al., 2000.



Une étude récente réalisée en Irlande avec une nouvelle technique qui semble apporter un niveau supplémentaire de discrimination des isolats (RFLP-pUCD) a confirmé l'identité d'isolats bovins et d'isolats de blaireaux au sein de même régions [O'Brien *et al.*, 2000].

En France, des informations récentes laissent supposer l'implication possible d'animaux sauvages dans la transmission de *M. bovis* à des animaux domestiques. Le typage approfondi des isolats issus de ces différentes espèces animales devrait permettre de valider ou non cette hypothèse.

1.1.2. Transmission à l'Homme

En matière de zoonoses, deux publications récentes montrent qu'il peut être possible, grâce aux techniques de biologie moléculaire, de confirmer ou au contraire de rejeter l'hypothèse d'un lien entre tuberculose humaine et animale.

Une étude réalisée en Australie a porté sur des professionnels des abattoirs, ainsi que sur des populations tout venant, dont des immigrés [Cousins *et al.*, 1999].

Les quatre techniques utilisées (RFLP/IS6110, RFLP/DR, RFLP/PGRS et spoligotypage) ont convergé pour identifier les mêmes marqueurs chez les isolats d'origine bovine et chez les isolats d'origine humaine dans le cas de populations exposées professionnellement.

A l'inverse, elles ont révélé que les profils observés chez les isolats issus de la population d'immigrés infectés par *M. bovis* étaient totalement différents de ceux des bovins d'Australie, montrant que la

contamination humaine avait précédé l'entrée en Australie.

En Tanzanie, une étude menée en milieu pastoral a montré l'identité des profils chez les pasteurs et les bovins avec les trois techniques utilisées (RFLP/PGRS, spoligotypage et électrophorèse en champ pulsé) [Kazwala *et al.*, 1997].

1.3. DEMONTRER L'EXISTENCE D'UNE DOUBLE INFECTION OU D'UNE REINFECTION

En médecine humaine, l'obtention de bandes d'intensité différente, notamment lors de l'utilisation de techniques de RFLP, permet de suspecter la co-infection d'un individu par deux isolats différents [Pavlic *et al.*, 1999]. Une telle hypothèse peut être vérifiée en réalisant des typages à partir de différentes colonies issues d'une même culture.

De même, les techniques de typage moléculaire sont très précieuses lorsque, chez l'Homme, on réisole *M. tuberculosis* malgré un traitement, afin de déterminer s'il s'agit d'une réinfection ou du développement d'une résistance aux anti-tuberculeux chez l'isolat de départ [Sonnenberg *et al.*, 2000]. Le typage approfondi des isolats obtenus avant et après traitement permet ainsi une meilleure évaluation de l'efficacité des traitements anti-tuberculeux chez l'Homme.

En médecine vétérinaire des animaux de rente, l'unité épidémiologique étant le troupeau, il peut être important de rechercher si la tuberculose dans un cheptel peut avoir eu plusieurs sources. L'utilisation du spoligotypage a ainsi permis d'obtenir en Grande-Bretagne les résultats récapitulés dans le tableau II. Ces données montrent que plusieurs spoligotypes peuvent coexister dans un nombre non négligeable de cheptels.

Mais pour savoir s'il y a véritablement coexistence d'isolats différents dans un même cheptel, le spoligotypage devrait être complété par d'autres techniques de typage moléculaire.

TABLEAU II

Multiplicité des spoligotypes dans un même cheptel bovin [d'après Clifton *et al.*, 1998]

Nombre de spoligotypes/cheptel	Nombre d'élevages	Pourcentage d'élevages
1	623	87,9
2	69	9,7
3	15	2,1
4	1	0,1
5	1	0,1
Total	709	100,0

1.4. DEMONTRER L'EXISTENCE DE CONTAMINATIONS CROISEES AU LABORATOIRE

A ce jour, seuls des laboratoires de diagnostic de la tuberculose humaine ont publié des informations concernant l'existence de contaminations croisées.

Ce phénomène, qui ne pouvait être évalué précédemment qu'à l'aide de bactériophages [Jones, 1988], a longtemps été considéré comme très rare. Son taux de prévalence actuel a été réévalué à un minimum de 0,1% [Bhattacharya *et al.*, 1998], et oscille dans la majorité des cas entre 1% et 3,5% selon les auteurs [Bauer *et al.*, 1997 ; Braden *et al.*, 1997 ; Ito *et al.*, 1999]. Cette augmentation apparente peut être imputée, d'une part, au fait que l'automatisation du diagnostic bactériologique a pu induire un accroissement des risques de contaminations croisées [Gascoyne-Binzi *et al.*, 2001], d'autre part, au fait qu'elles sont devenues beaucoup plus faciles à détecter avec l'avènement des techniques de typage moléculaire. Ainsi, on peut être amené à constater qu'à partir de prélèvements traités le même jour, on obtient des isolats possédant le même profil pour les marqueurs étudiés, alors qu'ils ne présentent aucun lien épidémiologique. Les essais d'isolement ultérieurs à partir de ces prélèvements permettent de confirmer qu'une contamination de certains tubes par un des isolats, reconnaissable à son profil, est survenue à l'étape de l'isolement primaire.

Dans le cas d'isolats « NSOP » (negative smears, one positive), c'est-à-dire correspondant à des frottis sans bacille acido-alcoolo-résistant et dont une seule culture a été positive [Nivin *et al.*, 1998], le taux de cultures faussement positives fait un bond spectaculaire à 56%, le typage confirmant l'existence d'une anomalie. Toutes les tentatives ultérieures d'isolement de *M. tuberculosis* à partir des prélèvements NSOP demeurent en effet infructueuses. Du fait de l'impact énorme de ces erreurs par excès, à l'origine de traitements anti-tuberculeux injustifiés, certains auteurs

proposent de typer au moins les isolats correspondant à la catégorie des NSOP [Braden *et al.*, 1997 ; de C. Ramos *et al.*, 1999 ; Nivin *et al.*, 1998]. En médecine vétérinaire, la question d'un tel typage systématique se pose aussi en France avec acuité, même si l'automatisation n'est pas encore pratiquée. En effet, la mise en évidence de *M. bovis* à partir d'un prélèvement a une conséquence lourde et obligatoire depuis mai 1999, à savoir l'abattage total du cheptel [Anonyme, 1999].

2. ETUDES PLUS GLOBALES

Une dernière catégorie d'applications, plus globales ne nécessite pas d'atteindre un degré de discrimination aussi poussé que dans les cas précédents. Il peut notamment s'agir :

- de déterminer les profils dominants dans un pays ;
- de réaliser des études phylogénétiques ;
- de mettre en évidence de nouvelles sous-espèces.

2.1. IDENTIFICATION DES PROFILS DOMINANTS DANS UN PAYS

Ceci pourrait éventuellement permettre de tracer l'origine géographique d'un isolat, lorsqu'on suppose qu'il a été importé, à l'image de ce qui est déjà pratiqué couramment pour certaines maladies, comme la rage.

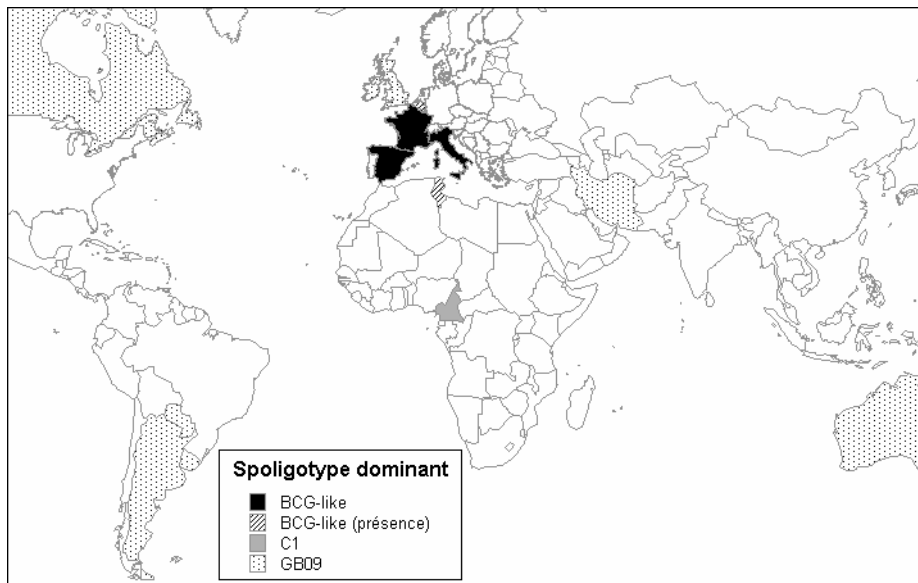
Mais une telle application suppose aussi une standardisation des techniques et surtout de la nomenclature à l'échelle internationale, ce qui n'est pas encore le cas pour la tuberculose.

En regardant les profils publiés par différents auteurs dans le monde, nous avons cependant pu reconstituer certaines dominantes (figure 5), qui montrent qu'un travail plus consensuel entre les différentes équipes dans le monde pourrait avoir d'importantes applications.

Ainsi, il s'avère qu'en Europe occidentale, et peut-être dans le bassin méditerranéen, le spoligotype dominant pourrait être celui que nous avons intitulé « BCG-like », car il est identique à celui des souches vaccinales BCG [Haddad *et al.*, 1999]. Il est intéressant de noter que le spoligotype « BCG-like », n'a jamais été décrit à ce jour en Angleterre, alors que des milliers d'isolats y ont été typés. Si un isolat présentant le spoligotype « BCG-like » y était signalé, il serait tentant d'invoquer une origine étrangère, en particulier « latine ».

A l'opposé, un autre spoligotype, GB09, domine en Grande-Bretagne et dans divers pays ayant tissé des liens privilégiés avec l'Angleterre au début du 20^e siècle (Iran), au 19^e siècle (Argentine, Australie) et bien avant encore (Canada) [Cousins *et al.*, 1998 ; Zumarraga *et al.*, 1999].

FIGURE 5
Distribution géographique de certains spoligotypes dominants dans le monde



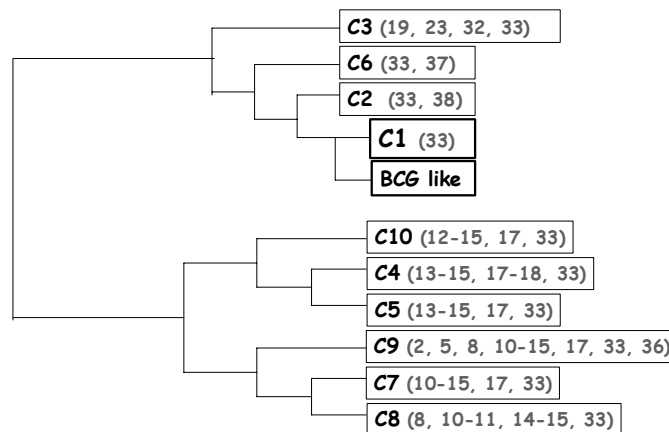
2.2. REALISATION D'ETUDES PHYLOGENETIQUES

Comme illustration de ce type d'étude, il est intéressant de noter que pour *M. bovis*, le spoligotype dominant au Cameroun, pays doté de liens historiques avec la France, et qui a importé beaucoup de bovins de France au début du 20^è siècle, ne diffère que par un « spacer », le « spacer » 30 (figure 2b), du spoligotype « BCG-like ». En outre, il est frappant de constater que tous les isolats du Cameroun qui ont été typés présentaient une

délétion de ce « spacer ». Ceci nous a conduit à envisager l'hypothèse d'un lien phylogénétique entre tous les isolats du Cameroun d'une part, et entre le spoligotype dominant au Cameroun, appelé C1, qui est aussi le plus conservé, et le spoligotype dominant en France, « BCG-like » d'autre part [Njanpop-Lafourcade *et al.*, 2001]. Cette hypothèse est illustrée dans la figure 6.

FIGURE 6
Modèle phylogénétique élaboré à partir des spoligotypes d'isolats de *M. bovis* du Cameroun
 [d'après Njanpop-Lafourcade *et al.*, 2001].

C1 à C10 : spoligotypes caractérisés sur 75 isolats du Cameroun. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux « spacers » manquants, à l'exception des « spacers » 3, 9 et 16 qui sont absents chez tous les isolats des souches de *M. bovis* et ne sont donc pas mentionnés.



Dans le cas de *M. tuberculosis*, la présence de profils voisins et très caractéristiques en spoligotypage, a permis à Qian *et al.* [1999] et à van Soolingen *et al.* [1995] de conclure à la présence d'une « famille » dominante (plus de 70% des isolats) et d'apparition récente, la famille « Beijing », constituée d'isolats tous reliés génétiquement, qui a envahi plusieurs pays d'Asie du sud-est [Anh *et al.*, 2000].

2.3. NOUVELLES SOUS-ESPECES

La mise en évidence de profils inhabituels pour un marqueur peut aboutir à l'identification d'une nouvelle sous-espèce. Ainsi, l'observation de profils particuliers en spoligotypage chez des isolats obtenus chez des chèvres en Espagne a conduit à des investigations poussées, tant phénotypiques que génotypiques, et à proposer la création d'une nouvelle sous-espèce, *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* [Aranaz *et al.*, 1999].

IV - CONCLUSION

En conclusion, la biologie moléculaire a fait connaître un essor considérable à la caractérisation et au typage des isolats agents de tuberculose.

D'autres perspectives s'offriront bientôt, notamment l'accès à un système à la carte, grâce à la technologie des puces à ADN. Elles permettront de s'affranchir de la plupart des freins techniques.

Mais si l'on veut que ces techniques permettent de rendre réellement service à l'épidémiologie, il sera plus que jamais nécessaire d'adopter une démarche raisonnée, pragmatique, adaptée aux objectifs et de mettre systématiquement en première ligne la confrontation des résultats aux données épidémiologiques fournies par le terrain.

V - BIBLIOGRAPHIE

1. Alito A., Morcillo N., Scipioni S., Dolmann A., Romano M.I., Cataldi A. and van Soolingen D. ~ The IS6110 restriction fragment polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outuberculosereak investigation. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:788-791.
2. Anh D.D., Borgdorff M.W., Van L.N., Lan N.T., van Gorkom T., Kremer K. and van Soolingen D. ~ *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.*, 2000, **6**:302-305.
3. Anonyme ~ Arrêté du 4 mai 1999 modifiant l'arrêté du 16 mars 1990 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective de la tuberculose bovine et le complétant en matière de tuberculose caprine. *J. Off. Rép. française*, 2 juin 1999, p. 8131-8133.
4. Anonyme ~ Enquête statistique annuelle 1998. Direction Générale de l'Alimentation, Ed. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2000a, Paris, France.
5. Anonyme ~ Décision C(2000)-4069 modifiant la décision 99/467/CE établissant le statut de cheptels officiellement indemnes dans certain états membres ou régions d'états membres. *J. Officiel Commun. Europ. (ECOJ)*, 2000b.
6. Aranaz, A., Liebana E., Gomez-Manpaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., Blasquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G., Dominguez L. ~ *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**:1263-1273.
7. Aranaz A., Liebana E., Mateos A., Dominguez L., Cousins S. ~ Restriction Fragment Length Polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.*, 1998, **61**:311-324.
8. Aranaz A., Liebana E., Mateos A., Dominguez L., Vidal D., Domingo M., Gonzalez O., Rodriguez-Ferri E.F., Bunschoten A.E., van Embden J.D.A. and Cousins D. ~ Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**:2734-2740.
9. Bauer J., Andersen A.B., Kremer K. and Miorner H. ~ Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in

- Danmark. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:2602-2606.
10. Bauer J., Thomsen V.O., Poulsen S. and Andersen A.B. ~ False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**:988-991.
 11. Bénét J.J. ~ Pour en finir avec la tuberculose. *Bulletin des Groupements techniques vétérinaires (GTV)*, 2001, (sous presse).
 12. Bhattacharya M., Dietrich S., Mosher L., Siddiqui F., Reisberg B.E. and Warren Jr P.W.S. ~ Cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis*: clinical significance, causes and prevention. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1998, **109**:324-330.
 13. Braden C.R., Templeton G.L., Stead W.W., Bates J.B., Cave M.D. and Valway S.E. ~ Retrospective detection of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. *Clin. Infect. Dis.*, 1997, **24**:35-40.
 14. Brittain D., Skuce R.A. and Neill S.D. ~ Evidence for the uni-directional evolution of the direct repeat region in TUBERCULOSE complex mycobacteria. Abstracts de la 5^e conférence Internationale sur *Mycobacterium bovis*, 15-18 août 2000, Cambridge (GB).
 15. Clifton-Hadley R.S., Inwald J, Archer J., Hughes S., Palmer N., Sayers A.R., Sweeney K., van Embden J.D.A. and Hewinson R.G. ~ Recent advances in DNA fingerprinting using spoligotyping - Epidemiological applications in bovine tuberculosis. *BCVA*, 1998, **6**:79-82.
 16. Cole S.T and Barrell B.G. ~ Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found. Symp.*, 1998, **217**: 160-172.
 17. Costello E., O'Grady D., Flynn O., O'Brien R., Rogers M., Quigley F., Egan J. and Griffin J. ~ Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:3217-3222.
 18. Cousins D., Williams S., Liebana E., Aranaz A., Bunschoten A., van Embden J. and Ellis T. ~ Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**:168-178.
 19. Cousins D. V., Williams S.N. and Dawson D.J. ~ Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population : DNA typing of isolates, 1970-1994. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1999, **3**:722-731.
 20. de C. Ramos M., Soini H., Roscanni G.C., Jaques M., Villares M.C. and Musser J.M. ~ Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:916-919.
 21. Devallois A., Horgen L., Sola C. and Rastogi N. ~ Le typage moléculaire des mycobactéries. *Path. Biol.*, 1998, **46**:625-636.
 22. Durr P. A., Clifton-Hadley R.S. and Hewinson R.G. ~ Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2000a, **19**:675-688.
 23. Durr P. A., Clifton-Hadley R.S. and Hewinson R.G. ~ Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2000b, **19**:689-701.
 24. Fang Z. and Forbes K.J. ~ A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**:479-501.
 25. Filliol I., Ferdinand S., Negroni L., Sola C. and Rastogi N. ~ Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**:2520-2524.
 26. Frothingham R. and Meeker-O'Connell W.A. ~ Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 1998, **144**:1189-1196.
 27. Gascoyne-Binzi D.M., Barlow R.E., Frothingham R., Robinson G., Collins T.A., Gelletlie R. and Hawkey P.M. ~ Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using Variable Number Tandem Repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**:69-74.
 28. Goyal M., Lawn S., Afful B., Acheampong J.W., Griffin G. and Shaw R. ~ Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *J. Infect.*, 1999, **38**:171-175.
 29. Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D.A., Young D.B. and Shaw J.R. ~ Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**:647-651.
 30. Groenen P., Bunschoten A., van Soolingen D. and van Embden J.D.A. ~ Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiol.*, 1993, **10**:1057-1065.

31. Guiterrez M., Samper S., Gavigan J.A., Garcia Marin J.F. and Martin C. ~ Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**:2953-2956.
32. Haddad N., Ostyn A., Durand B., Karoui C., Inwald J., Hughes S., Thorel M.F. and Hewinson G. ~ Differentiation by spoligotyping of strains of *Mycobacterium bovis* isolated in France. In Abstract book of the 30th World Conf. of the Internat. Union Against Tuberc. Lung Dis. (UICTMR), Intern. J. Tuberc. Lung Dis., 1999, 3 (suppl. 1): S203 (abstr. 199-PD), Madrid (Spain).
33. Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Inwald J., Hughes S., Thorel M.F., Hewinson R.G. and Durand B. ~ A ten years' study by spoligotyping of strains of *Mycobacterium bovis* isolated in France. 5^{ème} Conférence Internationale sur les *Mycobacterium bovis* (*Mycobacterium bovis* 2000), Cambridge, England, 16-18 August 2000.
34. Hermans P.W.M., van Soolingen D., Bik E.M., de Haas P.E.W., Dale J.W. and van Embden J.D.A. ~ Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.*, 1991, **59**:2695-2705.
35. Horgen L., Sola C., Devallois A., Goh K.S. and Rastogi N. ~ Follow up of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in the French West Indies by IS6110-DNA fingerprinting and DR-based spoligotyping. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1998, **21**:203-212.
36. Ito K., Takahashi, M., Yoshiyama T., Wada M., Nakazono T., Ogata H., Mizutani S. and Sugita H. ~ Cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* culture in clinical laboratories. *Kakkaku*, 1999, **74**:777-788.
37. Jones Jr W.D. ~ Bacteriophage typing of *Mycobacterium tuberculosis* cultures from incidents of suspected laboratory cross-contamination. *Tubercle*, 1988, **69**:43-46.
38. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M. and van Embden J. ~ Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**:907-914.
39. Kazwala R., Sinclair K., Challans J., Kambarage D.M., Sharp J.M., van Embden J.D.A., Daborn C.J. and Nyange J. ~ Zoonotic importance of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in Tanzania: a molecular biology approach. Actes Editions, 1997, Rabat (Morocco).
40. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., de Haas W.H., Hermans P.W.M., Martin C., Palittapongpim P., Plikaytis B.B., Riley L.W., Yakrus M.A., Musser J.M. and van Embden J.D.A. ~ Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:2607-2618.
41. Niemann S., Richter E. and Rüscher-Gerdes S. ~ Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:409-412.
42. Niemann S., Richter E. and Rüscher-Gerdes S. ~ Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**:152-157.
43. Nivin B., Fujiwara P.I., Hannifin J. and Kreiswirth B.N. ~ Cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*: an epidemiological and laboratory investigation. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 1998, **19**:500-503.
44. Njanpop-Lafourcade B. M., Inwald J., Ostyn A., Durand B., Hughes S., Thorel M.F., Hewinson G. and Haddad N. ~ Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from the Cameroon. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**:222-227.
45. O'Brien R., Flynn O., Costello E., O'Grady D. and Rogers M. ~ Identification of a novel DNA probe for strain typing *Mycobacterium bovis* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**:1723-1730.
46. Pavlic M., Allerberger F., Dierich M.P. and Proding W.M. ~ Simultaneous infection with two drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains in an immunocompetent host. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:4156-4157.
47. Qian L., van Embden J.D.A., van der Zanden A.G.M., Weeltevreden E.F., Duanmu H. and Douglas J.T. ~ Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:471-474.
48. Ramakrishnan L., Federspiel N.A. and Falkow S. ~ Granuloma specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the Glycine-Rich PGRS family. *Science*, 2000, **288**:1436-1439.

49. Roring S., Hughes M.S., Skuce R.A. and Neill S.D. ~ Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Vet. Microbiol.*, 2000, **74**: 227-2236.
50. Ross B.C, Raios K., Jackson K., and Dwyer B. ~ Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**:942-946.
51. Serraino A., Marchetti G., Sanguinetti V., Rossi M.C., Zannoni R.G., Catozzi L., Bandera A., Dini W., Mignone W., Franzetti F. and Gori A. ~ Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle : genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:2766-2771.
52. Sola C, Devallois A, Horgen L, Maisetti J, Filliol I, Legrand E and Rastogi N. ~ Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg. Infect. Dis.*, 1999, **5**:404-14.
53. Sola C., Horgen L., Devallois A. and Rastogi N. ~ Combined numerical analysis based on the molecular description of *Mycobacterium tuberculosis* by four repetitive sequence-based DNA typing systems. *Res. Microbiol.*, 1998, **149**:349-360.
54. Sonnenberg P., Murray J., Shearer S., Glynn J.R., Kambashi B. and Godfrey-Faussett P. ~ Tuberculosis treatment failure and drug resistance - Same strain or reinfection ? *Trans. R. Soc. Trop. Hyg.*, 2000, **94**:603-607.
55. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., Connell N.D., Kreiswirth B.N., Whittam T.S. and Musser J.M. ~ Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, **94**:9869-9874.
56. Taylor G., Goyal M., Legge A.J., Shaw R.J. and Young D. ~ Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from medieval human remains. *Microbiology*, 1999, **145**:899-904.
57. Thierry D., Brisson-Noel A., Vincent-Lévy-Frébault V., Nguyen S., Guesdon J.L., and Gicquel B. ~ Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**:2668-2673.
58. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas P.E., Hermans P.W., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls LM, van Embden J.D. ~ A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**:1236-1245.
59. van Soolingen D., Qian L., de Haas P.E.W., Douglas J.T., Traore H., Portaels F., Qing H.Z., Enkhsaikan D., Nymadawa P. and van Embden J.D.A. ~ Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**:3224-3228.
60. Viana-Niero C., Guiterrez C., Sola C., Filliol I., Boulhbal F., Vincent V. and Rastogi N. ~ Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number tandem repeats. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**:57-65.
61. Yang Z., Ijaz K., Bates J.H., Eisenach K.D. and Cave M.D. ~ Spoligotyping and Polymorphic GC-Rich Repetitive Sequence Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**:3572-3576.
62. Yeh R.W., Ponce de Leon A., Agasino C.B., Hahn J.A., Daley C.L., Hopewell P.C. and Small P. ~ Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J. Infect. Dis.*, 1998, **177**:1107-1111.
63. Yuen L.K.W., Ross B.C., Jackson K.M. and Dwyer B. ~ Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**:1615-1618.
64. Zumarraga M., Martin C., Samper S., Alito A., Latini O., Bigi F., Roxo E., Cicuta M.E., Errico F., Ramos M.C., Cataldi A., van Soolingen D. and Romano M.I. ~ Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**:296-303.

