

PREMIERE CARACTERISATION MOLECULAIRE DE SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* ET *MYCOBACTERIUM CAPRAE* PAR SPOLIGOTYPAGE EN ALGERIE*

Naima Sahraoui^{1,2}, Borna Muller³, Djamel Guetarni¹, Fadila Boulahbal⁴,
Djamel Yala⁴, Rachid Ouzrout² et Jakob Zinsstag³

RESUME

Nous caractérisons pour la première fois les souches responsables de la tuberculose bovine chez les bovins récoltées dans deux abattoirs de la région nord de l'Algérie. Les résultats présentés ont déjà fait l'objet d'une publication [Sahraoui *et al.*, 2009].

D'un ensemble de 100 animaux, 101 souches bactériennes ont été isolées dont 88 étaient des souches de *Mycobacterium bovis*, une souche ayant un profil de *Mycobacterium caprae* et 12 autres souches appartenaient à d'autres espèces bactériennes.

Les 89 souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) ont été caractérisées par spoligotypage : 23 spoligotypes différents ont été obtenus dont deux prédominants (SB0120 et SB0121) représentant respectivement (39%) et (21%) des isolats. De ces 23 spoligotypes identifiés, 18 spoligotypes ont déjà été cités et cinq spoligotypes y compris le spoligotype de la souche *M. caprae* n'avaient jusqu'à présent jamais été décrits.

Au total, 88% des souches de *M. bovis* isolées montraient des spoligotypes déjà détectés en France dont plusieurs types étaient auparavant également trouvés dans d'autres pays européens. Nos résultats nous laisseraient supposer que l'origine de la majorité des souches de *M. bovis* retrouvées au nord de l'Algérie est européenne, par suite de l'introduction de bovins exportés vers l'Algérie.

Mots-clés : tuberculose bovine, abattoir, spoligotypage, Algérie.

SUMMARY

Bovine tuberculosis is prevalent in Algeria and causes highly significant losses. This study was carried out in two slaughterhouses in the northern part of Algeria.

A total of 7 250 animals were examined. Post-mortem inspection demonstrated tuberculosis-like lesions in 260 of these animals. Samples were collected from affected organs for culture, bacteriological examination and characterization by molecular typing techniques.

One hundred and one bacterial strains were isolated from a total of 100 animals, 88 of these were identified as *M. bovis*; one was a strain of *M. caprae* (SB1451) and 12 were strains of other bacterial species. Spoligotyping of the 89 *Mycobacterium tuberculosis* complex strains revealed a total number of 23 different spoligotypes with two types (SB0120 and SB0121) being most frequently found and accounting for 39% and 21% of the strains isolated, respectively.

.../..

* Article reçu le 11 juillet 2009, accepté le 4 janvier 2010

¹ Université Saad DAHLAB, Blida, Algérie

² Centre universitaire d'El-Tarf, Algérie

³ Institut Tropical Suisse, Socinstrasse 57, Basel, Switzerland

⁴ Service de la tuberculose et des mycobactéries, Institut Pasteur d'Algérie

.../..

Of the 23 spoligotype patterns observed, 18 types had been previously reported. The remaining 4 had not been described so far.

Altogether, 88% of the *M. bovis* strains detected showed spoligotype patterns previously described in strains from France and some had also been detected in strains from other European countries. Our results suggest that the majority *M. bovis* strains identified in Algeria are of European origin.

Keywords: Bovine tuberculosis, Slaughterhouse, Bacterial culture, Spoligotyping, Algeria.



I - INTRODUCTION

Le cheptel national bovin compte actuellement plus de 1.6 millions de têtes dont 58% sont des vaches laitières. On distingue deux types de système de production dans l'élevage bovin [Anonyme, 2005] :

- Le système extensif comprend les races locales et les races croisées. Cet élevage est orienté vers la production de viande (78% de la production nationale), il assure également 40% de la production laitière nationale.
- Le système intensif repose principalement sur les races importées. Ce type d'élevage est orienté vers la production laitière. La taille des troupeaux est relativement faible : six à huit vaches laitières par exploitation. Le système intensif représente 30% de l'effectif bovin et assure près de 20% de la production bovine nationale.

Ce dernier est identifié et agréé par l'Etat, alors que certaines exploitations constituées de races croisées et locales sont non agréées.

Il faut mentionner que les campagnes biennuelles de dépistage de la tuberculose et de la brucellose du bétail laitier concernent uniquement les étables agréées dont la production laitière est destinée au centre de collecte de lait, par conséquent, elles ne portent que sur un nombre faible d'animaux par rapport au nombre de bovins existants. Pour cela, l'absence d'une identification généralisée des bovins ne permet pas de mettre en place une réglementation de la circulation du bétail et un contrôle approprié

des mouvements des animaux et on estime que le cheptel bovin national dépasse les valeurs citées ci-dessus.

En Algérie, la tuberculose bovine est dépistée par tuberculination et l'inspection des carcasses dans les abattoirs. Ces deux outils ne permettent pas d'identifier exhaustivement les animaux infectés. La mise en place d'un outil de diagnostic permettant la caractérisation des souches à l'origine de l'infection reste indispensable pour confirmer ou infirmer une suspicion de tuberculose sans ambiguïté.

Afin de compléter le diagnostic des tests tuberculiques et de détection à l'abattoir, la mise en place d'un outil de diagnostic permettant la caractérisation de souches est indispensable pour identifier l'agent causal et le caractériser avec plus de fiabilité et de précision [Maugein et Bebear, 2003].

Le spoligotypage est la méthode la plus utilisée pour la caractérisation des souches de *M. bovis*, notamment pour mener des études d'épidémiologie moléculaire. Elle peut éventuellement être utilisée pour l'identification d'une espèce du complexe de *Mycobacterium tuberculosis*, et la différenciation des souches à l'intérieur du même espèce appartenant à ce complexe, y compris *M. bovis* et peut aussi distinguer *M. bovis* de *M. tuberculosis* [Heifets et Jenkins, 1998] et de *M. caprae* [Prodinger *et al.*, 2005]. Cette technique est facile à mettre en oeuvre, c'est pourquoi elle est largement répandue. La standardisation est également aisée, ce qui facilite les comparaisons entre publications [Walravens *et al.*, 2006].

L'objectif de cette étude est d'appliquer la technique de spoligotypage sur des souches de *M. bovis* et *M. caprae* provenant de deux abattoirs de la région nord de l'Algérie pour le

typage et la caractérisation. Les résultats présentés ont déjà fait l'objet d'une publication [Sahraoui *et al.*, 2009].

II - MATERIEL ET METHODES

1. ECHANTILLONS

Des prélèvements d'organes et de ganglions ont été récoltés durant la période d'août à novembre 2007 dans deux abattoirs situés au nord de l'Algérie sur des carcasses de bovins saisies pour cause de tuberculose.

Durant cette période, 7 250 bovins abattus ont été examinés ; cette inspection nous a permis de collecter 260 échantillons. Ces derniers ont été recueillis dans des pots stériles accompagnés d'une fiche de renseignements. Tous les prélèvements ont été transportés sous glace à l'institut Pasteur de l'Algérie.

2. EXAMEN BACTERIOLOGIQUE

Ces échantillons ont fait l'objet d'un examen microscopique, d'une mise en culture et d'une identification biochimique.

Au laboratoire, les spécimens ont été sectionnés en petits morceaux en utilisant des lames stériles et des boîtes de Pétri. Les fragments ainsi préparés sont homogénéisés avec un mortier et un pilon. L'homogénat a été décontaminé, en y ajoutant 4 ml d'acide sulfurique à 4%, puis neutralisé par NaOH à 6% en utilisant le bleu de bromothymol comme indicateur. La neutralisation a été atteinte lorsque la couleur de la solution a changé, passant du jaune au vert.

Ensuite, 2 ou 3 ml de la suspension de chaque échantillon ont été étalés sur deux tubes de milieu de Löwenstein-Jensen, l'un enrichi de pyruvate de sodium et l'autre enrichi du glycérol. Les cultures ont été incubées à 37° C pendant 12 semaines avec une observation hebdomadaire de la croissance des colonies. Quand la croissance est visible, des frottis ont été préparés et colorés par la technique de Ziehl- Neelsen.

Une identification primaire de toutes les souches isolées était basée sur les délais d'apparition des colonies et leur morphologie. L'identification proprement dite a consisté en la réalisation de trois tests biochimiques, à

savoir, la réduction des nitrates, l'accumulation de la niacine et l'activité catalasique thermolabile à 68° C.

3. EXTRACTION D'ADN

Cent une cultures positives ont été transportées au laboratoire du centre national des mycobactéries à Zurich en Suisse pour l'extraction de l'ADN. Cette procédure a été réalisée selon le protocole décrit dans le kit de InstaGene™ Matrix (*Bio Rad*®)

4. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE

L'identification moléculaire a été effectuée après mise en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen. La méthode d'identification utilisée est la technique de spoligotypage qui caractérise la structure du locus DR.

Cent une souches différentes ont été analysées par cette technique qui n'a concerné que 101 isolats et 33 ont été retirés de l'analyse. Cette analyse a été effectuée au Veterinary Laboratories Agency à Weybridge en Angleterre selon le protocole publié par Kamerbeek *et al.* [1997].

Les résultats présentés ont été comparés et intégrés dans les bases de données internationales (www.Mbovis.org, SpolDB4). Leur nomenclature a été utilisée pour définir les profils dans cette étude.

Les souches ont été également identifiées par délétion de la région RD4 selon le protocole décrit par Brosch *et al.* [2002].

De plus, nous avons confirmé l'absence de la région RD12 dans le génome de la souche de *M. caprae*.

Le séquençage des 12 souches n'appartenant pas au CMT a été effectué au Centre national des mycobactéries de Zurich, tel que décrit par Zucol *et al.* [2006].

III - RESULTATS

La prévalence globale des lésions suspectes était de 3,58%. Les lésions ont essentiellement été trouvées dans les ganglions pulmonaires et les poumons.

Sur les 260 prélèvements mis en culture, nous avons obtenu 134 cultures positives (51,54%), 106 cultures négatives (40,77%) et 20 cultures contaminées (7,69%). Les cultures positives ont été confirmées par coloration de Ziehl-Neelsen.

La technique de spoligotypage a permis d'identifier 88 souches de *M. bovis* caractérisées par l'absence des spacers 3, 9, 16 et 39 à 43. En plus, une souche (SB1451) ne possédait pas les spacers 1,3-16, ce qui indique que cette souche est un *M. caprae* [Proding et al., 2005].

Par ailleurs, le séquençage du gène 16S r RNA de douze autres souches a identifié trois mycobactéries non tuberculeuses, la première souche présentait une grande similitude avec *M. chitae* (97,7% des séquences identiques); la deuxième était fortement liée à *M. brasiliensis* (98,4% des séquences identiques) et la troisième montrait une grande similarité avec *M. acapulcensis* et *M. flavescens* (99,7% des séquences identiques pour chacune d'elles). Quatre souches de *Rhodococcus equi* et cinq autres souches appartenant à d'autres

espèces bactériennes (*Ureibacillus thermophaericus*, *Corynebacterium spp.*, *Paenibacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus spp.*).

Ainsi, parmi les souches de *M. bovis* typées par spoligotypage ($n = 101$), seulement 4 se sont révélées nouvelles (4,49%), à savoir, SB1447, SB1448, SB1449 et SB1450, et les 84 autres souches présentaient un profil déjà décrit dans d'autres pays du monde, par comparaison avec la banque de données mondiale en leur attribuant un numéro type dans cette banque.

Parmi les 88 souches de *M. bovis*, 15 présentaient un profil unique c'est-à-dire retrouvé une seule fois dans l'étude.

La figure 1 présente l'ensemble des spoligotypes isolés en Algérie.

Le profil dominant en Algérie (SB0120) est rencontré dans 35 souches (39%) et le SB0121 était présent dans 19 isolats (21%).

L'absence de la région RD4 a été mise en évidence, confirmant l'identité de *M. bovis* pour les 88 souches. Alors que pour la souche *M. caprae* (SB1451), cette région était présente. Nous avons aussi confirmé l'absence de la région RD12 chez cette même souche [Smith et al., 2006].

IV - DISCUSSION

Ce travail constitue une première en Algérie pour la caractérisation moléculaire des souches de mycobactéries. L'utilisation du spoligotypage comme méthode de caractérisation permet une bonne appréciation de la diversité. Cette technique se caractérise par une grande sensibilité et spécificité [Kamerbeek et al., 1997].

Pour les 88 souches de *M. bovis* isolées, quatre souches (SB1447, SB1448, SB1449 et SB1450) n'ont jamais été décrites nulle part dans le monde. Il en ressort que sur les 22 spoligotypes de *M. bovis* différents obtenus, deux sont prédominants (SB0120 et SB0121) et représentent 39% et 21%, respectivement.

Ces deux profils sont très proches de ceux décrits en France [Haddad et al., 2001], en Espagne [Aranaz et al., 1996], en Belgique [Walravens et al., 2006], en Italie et dans d'autres pays du monde. Il est à noter que les spoligotypes de 89% de *M. bovis* trouvés en Algérie ont déjà été détectés en France. Cependant, les trois types les plus fréquents en France sont aussi parmi les trois types les plus fréquents en Algérie (SB0120, SB0121, SB0134). Eu égard à ce qui précède, et comme l'Algérie a importé des bovins d'Europe, particulièrement de la France, il nous semble très plausible qu'il existe une relation directe entre les souches trouvées en Algérie et celles d'Europe.

Par conséquent, il est difficile de dire si l'Algérie appartient ou pas aux pays caractérisés par un haut niveau ou un faible niveau d'hétérogénéité des souches de *M. bovis*. Toutefois, nous supposons que l'Algérie appartient au groupe à faible hétérogénéité comme l'Australie [Cousins *et al.*, 1998], la Tanzanie [Kazwala *et al.*, 1997] et la Chine [van Soolingen *et al.*, 1995].

La caractérisation de la souche de *Mycobacterium caprae*, fondée sur l'absence des spacers 1, 3-16 et 39 à 43 comme observé en Europe [Prodinge *et al.*, 2005], reste une particularité de ce travail. En effet, *M. caprae* a été isolé pour la première fois chez les chèvres, mais sa présence ne se limite pas aux troupeaux caprins, elle a été également isolée chez d'autres hôtes, tels les bovins, les sangliers, les porcs et même l'homme comme rapporté par Aranaz *et al.* [1999] et Gutierrez *et al.* [1997]. Ces résultats supposeraient soit une transmission de l'infection tuberculeuse entre les bovins et les caprins en Algérie, par suite de la cohabitation des deux espèces animales. Mais l'infection due à *M. caprae* chez la chèvre n'a jamais été prouvée en Algérie et le diagnostic n'a jamais été réalisé

chez cette espèce), soit que la tuberculose due à *M. caprae* n'est pas restreinte aux chèvres et que d'autres espèces de mammifères sont atteintes également, principalement les bovins et c'est à l'occasion de l'introduction de bovins importés en Algérie que l'infection aurait pu s'introduire et se transmettre aux bovins locaux.

Il faut signaler que sur l'ensemble des animaux échantillonnés, nous avons isolé deux souches différentes sur le même animal, l'une était *M. bovis* et l'autre *R. equi*. Il s'agit donc d'une co-infection. Le *R. equi* se caractérise sur le plan lésionnel par des lésions pyogranulomateuses des poumons, caractéristique aussi de *Mycobacterium tuberculosis*, à laquelle elle est étroitement liée [Meijer et Prescott, 2004]. Les travaux sur *R. equi* indiquent que la majorité des gènes sont similaires à *M. tuberculosis* [Rahman *et al.*, 2003]. De plus, *R. equi* et *Mycobacterium* sont deux espèces qui appartiennent au même ordre, celui des Actinomycétales. Ce dernier contient un nombre de bactéries pathogènes qui inclue les genres *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium* [Goodfellow et Alderson, 1977].

V - CONCLUSION

Cette étude fournit, pour la première fois, quelques données caractérisant la variabilité des isolats de *M. bovis* en Algérie par l'approche moléculaire.

Toutefois, ce travail montre l'utilité du spoligotypage et de la caractérisation par délétion de la région RD4 pour l'identification des espèces et des souches responsables de la tuberculose en Algérie et l'acquisition de ces

outils permettra d'obtenir un diagnostic certain de la tuberculose bovine.

Le typage moléculaire des souches de *M. bovis* constitue donc un précieux outil pour déterminer l'origine de cette affection et orienter les enquêtes épidémiologiques amenant à apprendre des mesures appropriées de gestion. Ces éléments contribuent à une meilleure compréhension la dynamique d'infection de la tuberculose.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme - Annuaire statistique pour l'Afrique (volume N°1 - 2000) « ONU » et Doc. Ministère de l'Agriculture (2001-2005) 2005.

Aranaz A., Liebana E., Mateos A., Dominguez L., Vidal D., Domingo O. D., Gonzolez M., Rodriguez-Ferri E.F., Bunschoten A.E., van Embden J.D., 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.

Aranaz A., Liébana E., Gómez-Mampaso, E. & 8 other authors. - *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.
- Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K. *et al.* - A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Nalt. Acad. Sci. US*, 2002, **99**, 3684-3689.
- Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L., Prodinger W.M., Gori A., Al-Hajaj S.A., *et al.* - *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.*, 2006, **6**, 23.
- Cataldi, A.A. Gioffre A., Santangelo M.P., Alito A., Caimi K., Bigi F., Romano M.I., Zumarraga, M. - The genotype of the principal *Mycobacterium bovis* in Argentina is also that of the British Isles: did bovine tuberculosis come from Great Britain? *Rev. Argent. Microbiol.*, 2002, **34**, 1-6.
- Cousins D., Williams S., Liebana E., Aranaz A., Bunschoten A., van Embden J., Ellis T. - Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 168-178.
- Diguimbaye-Djaïbe C, Hilty M, Ngandolo R, Mahamat HH, Pfyffer GE, Baggi F *et al.* - *Mycobacterium bovis* isolates from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006, **12**, 769-771.
- Goodfellow M., Alderson G. - The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the rhodochrous" complex. *J. Gen. Microbiol.*, 1977, **100**, 99-122.
- Gutiérrez, M., Samper, S., Jiménez, M. S., van Embden, J. D. A., Marin, J. F. & Martín, C. - Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol.*, 1997, **35**, 3328-3330.
- Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Masselot M., Thorel M.F., Hughers S.L., Inwald J., Hewinson R.G., Durand B. - Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3623-3632.
- Heifets, L.B. and Jenkins, P.A. - Speciation of *Mycobacterium* in clinical laboratories. In: *Mycobacteria I. Basic Aspects*, Gangadharam, P.R. and Jenkins, P.A., (eds.) New York, USA: Chapman and Hall, 1998, 308-350.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M, van Soolingen D., Kuijper S. *et al.* - Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 907-914.
- Kazwala, R R.; Sinclair, K.; Challans, J.; Kambarage, D M.; Sharp, J M.; van Embden, J D A.; Daborn, C J.; Nyange, J. - Zoonotic importance of *Mycobacterium bovis* complex organisms in Tanzania: a molecular biology approach. In: Berrada J, Bouchriti N, Bouslikhane M., editors. - Animal tuberculosis in Africa and Middle East. Rabat, Morocco: Actes Editions, 1997, 199-204.
- Maugein J., Bebear C. - Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. *Méd. Mal. Infect.*, 2003, **33**, 153s-8s.
- Meijer W. G., Prescott J.F. - *Rhodococcus equi*. *Vet. Res.*, 2004, **35**, 383-396.
- Muller B., Steiner B., Bonfoh B., Fane A., Smith N.H. *et al.* - Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC, Vet. Res.*, 2008, **4**, 26.
- Müller B., Hilty M., Berg S., Garcia-Pelayo M., C Dale J., Boschioli M.L., Cadmus S., Bongo N., Ngandolo R., Godreuil S., Diguimbaye-Djaïbé C., Kazwala R., Bonfoh B. Njanpop-Lafourcade B.M., Sahraoui N., Guetarni D., Aseffa A., Mekonnen M.H., Rasolofo V. Razanamparany, Ramarokoto H., Dønne B., Oloya J., Machado A., Mucavele C., Skjerve E., Portaels F., Rigouts L., Michel A., Müller A., Källenius G., van Helden P. D., Hewinson R.G., Zinsstag J., Gordon S. V., Smith N. H. - African 1, an Epidemiologically Important Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. *J. Bacteriol.*, 2009 March; **191**(6), 1951-1960.

- Niemann S., Richter E., Rusch-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.
- Njanpop-Lafourcade B.M., Inwald J., Ostyn A., Durand B., Hughes S., Thorel M.F., Hewinson G., Haddad N. - Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 222-227.
- Prodinger W.M., Brandstatter A., Naumman L., Pacciarini M., Kubica T., Boschioli M., Aranaz A., Nagy G., Cvetnic Z., Oceppek M., Skrypnik A., Erler W., Niemann S., Pavlik I., Moser I. - Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 4984-4992.
- Rahman M., Herron L.L., Kaour V., Meijer W. G., Byrne B.A., Ren J., Nicholson V.M., Prescott J.F. - Overview of a partial genome sequence of *Rhodococcus equi*. ATCC 33701. *Vet. Microbiol.*, 2003, **94**, 143-158.
- Sahraoui N., Müller B., Guetarni D., Boulahbal F., Yala D., Ouzrout R., Berg S., Smith N.H Zinsstag J. - Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Vet. Res.*, 2009, **5**, 4.
- Schelling E., Diguimbaye C., Hilty M., Baggi F., Ngandolo R., Zinsstag J. - Epidémiologie moléculaire des premiers isolements de mycobactéries chez l'animal au Tchad. *Epidémiol. et santé anim.*, 2005, **48**, 81-91.
- Smith N.H., Gordon S.V., de la Rua-Domenech R., Clifton-Hadley R.S., Hewinson R.G. - Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Reviews Microbiol.*, 2006, **4**, 670-681.
- Van Soolingen D., Qian L., de Haas P.E.W, Douglas J.T, Traore H., Portaels F., Qing H.Z., Enkhsaikan D., Nymadawa P., van Embden J.D.A. - Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 3234-3238.
- Vynnycky E., Borgdorff M.W., Van Soolingen D., Fine P.E. - Annual *Mycobacterium tuberculosis* Infection Risk and Interpretation of Clustering Statistics. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, **9**, 176-83.
- Walravens K., Allix C., Supply P., Rigouts L., Godfroid J., Govaerts M., Portaels F., Dufey J., Vanholme L., Fauville-Dufaux M., Saegerman C. - Dix années d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose bovine en Belgique. *Epidémiol. et santé anim.*, 2006, **49**, 103-111.
- Zanini M.S., Moreira E.C., Salas C.E., Lopes M.T.P., Barouni A.S. Roxo E., Telles M.A., Zumarraga M.J. - Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from south-east Brasil by spoligotyping and RFLP. *J. Vet. Med.*, 2005, **B52**, 129-133.
- Zucol F., Ammann R.A., Berger C., Aebi C., Altwegg M., Niggli F.K. *et al.* - Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J. Clin. Microbiol.*, 200, **44**, 2750-2759.

