

# BACTÉRIOLOGIE

## Typage moléculaire de souches marocaines de *Mycobacterium tuberculosis*.

J. El Baghdadi (1), R. Lazraq (1), S. Ibrahimy (1) & A. Benslimane (1) (2)

(1) Unité des mycobactéries, Institut Pasteur du Maroc, 1 place Abou Kacem Ezzahraoui, B.P. 120, Casablanca, Maroc.  
Tél : (212.2) 26.94.24 / 27.57.78. Fax : (212.2) 26.09.57.

(2) Manuscrit n° 1786. " Bactériologie". Accepté le 18 juin 1997

**Summary:** Molecular Typing of Moroccan *Mycobacterium tuberculosis* isolates

The insertion sequence IS 6110 was used to differentiate clinical Moroccan isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using two non radioactive probes.

Among 16 strains isolated from patients clinically related, 10 had similar IS 6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns, confirming that they were derived from a common source. Two strains were isolated from the same patient (sputum, lymph node) showed identical profiles hybridized with IS 6110 element. Four sequential strains isolated from the same patients before treatment and after one year had identical IS 6110 RFLP patterns suggesting relapse and not reinfection. Twenty-one strains with identical drug susceptibility showed different IS 6110 RFLP profiles confirming no correlation between antibiotic resistance profiles and IS 6110 RFLP patterns.

Since, RFLP analysis by using IS 6110 element is a useful tool for the epidemiological survey of tuberculosis.

**Résumé :**

Afin de différencier les souches de *M. tuberculosis* isolées de 40 patients marocains atteints de tuberculose pulmonaire, le typage moléculaire à base de RFLP (restriction fragment length polymorphism) a été appliqué grâce au polymorphisme de position et de nombre d'une séquence d'insertion IS 6110 en utilisant deux sondes non radioactives.

Parmi les 16 souches isolées de patients ayant un lien de parenté, 10 ont présenté des profils RFLP similaires entre eux, indiquant une source de contamination commune. Deux souches isolées du même patient à différentes périodes à partir de deux types de prélèvement (crachat, ponction nodulaire) montrent un polymorphisme identique, indiquant que la même souche a entraîné les deux types d'infection ; ainsi les sites chromosomiques d'IS 6110 ne dépendent pas du site d'infection. Les isolements séquentiels de souches avant le début du traitement et après arrêt de traitement d'une année chez 2 patients ont montré que le polymorphisme génétique est identique avec acquisition d'une résistance à la rifampicine montrant ainsi qu'il s'agit d'une réactivation des lésions et non d'une réinfection. Vingt et une souches isolées de patients n'ayant aucune relation de parenté mais avec des résistances identiques montrent un polymorphisme génétique différent, confirmant l'absence de corrélation entre le profil RFLP suivi d'hybridation et la résistance aux antituberculeux. En conclusion, le typage moléculaire basé sur l'IS6110 reste d'une grande utilité dans la surveillance épidémiologique des infections à *M. tuberculosis*.

**Key-words:** *Mycobacterium tuberculosis* - IS 6110 - Restriction fragment length polymorphism (RFLP) - Molecular typing - Insertion sequence - Epidemiological marker - Casablanca - Morocco

**Mots-clés :** *Mycobacterium tuberculosis* - Typage moléculaire - Marqueur épidémiologique - Séquence d'insertion IS 6110 - Profil RFLP - Casablanca - Maroc

## Introduction

La tuberculose est l'une des maladies infectieuses les plus répandues. L'agent causal est une mycobactérie du complexe *tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). L'éradication de cette maladie ainsi que la détection de sources d'infection exige la discrimination entre les souches de *M. tuberculosis*.

Les anciennes méthodes appliquées pour l'identification du type de souches ont été basées sur la lysotypie (4), le sérotypage (14), le biotypage (23, 32) ou l'analyse des acides mycoliques de la paroi (5), mais ces techniques manquent de spécificité.

La découverte de séquences d'ADN répétées a permis de lever la dépendance vis-à-vis du phénotype. Ainsi, la séquence IS 6110 (18, 26), spécifique du complexe *M. tuberculosis*, stable, polymorphe et abondante, a permis le typage moléculaire des souches de *M. tuberculosis*. Par contre, l'IS 1081 (3) au niveau du complexe *M. tuberculosis*, a montré une très grande stabilité génétique et un faible polymorphisme.

Ainsi, des microépidémies de tuberculose résistantes ont été recensées à New York grâce au typage moléculaire basé sur l'IS 6110 (21). Son utilité comme marqueur épidémiologique a été démontrée dans les transmissions nosocomiales (1) et dans plusieurs études (2, 7, 9, 10, 13, 17, 19, 29). Toutefois, on aperçoit aujourd'hui la limite de cet élément comme outil épidémiologique avec la découverte d'une souche africaine (Burkina Faso) (27), de 2 souches marocaines (données non publiées) et de 5 souches vietnamiennes ne présentant pas cette séquence d'insertion (27, 33).

La méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction RFLP suivi d'hybridation avec l'IS 6110 nécessite plusieurs jours ; aussi des techniques de typage moléculaire rapides basées sur la polymérisation en chaîne (PCR) ont-elles été récemment appliquées (12, 16, 20, 22).

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'IS 6110 comme marqueur épidémiologique de la tuberculose par l'analyse de 43 souches isolées de patients marocains et identifiées comme *Mycobacterium tuberculosis*.

## Matériel et méthodes

### Patients

L'étude a été effectuée dans un seul centre de diagnostic spécialisé de tuberculose à Casablanca. La collecte des données cliniques et épidémiologiques a été faite pour les 40 patients répartis en deux groupes. Le premier groupe de 10 patients a été constitué de 7 patients ayant une relation de parenté entre eux et de 3 patients sans aucun lien épidémiologique. Le deuxième groupe de 30 patients a été constitué de 18 patients sans aucune relation épidémiologique et de 12 patients ayant un lien épidémiologique : 6 patients vivant deux à deux dans la même maison, 3 patients travaillant dans la même usine ; 2 patients ayant acquis une résistance à la rifampicine après un traitement inadéquat, 1 patient ayant attrapé une tuberculose pulmonaire et ganglionnaire à deux périodes différentes.

### Souches

Les 43 prélèvements (42 expectorations et une ponction nodulaire) ont fait l'objet d'un examen direct, culture et antibiogrammes.

Les souches ont été identifiées comme *M. tuberculosis* par les tests biochimiques (niacine, catalase, nitrate réductase) et par leur sensibilité au TCH (15). La sensibilité aux antituberculeux a été réalisée pour 37 souches selon la méthode de proportion de CANETTI, RIST et GROSSET (15) avec les concentrations d'antibiotiques suivantes : streptomycine (SM) 4.0 µg/ml, isoniazide (INH) 0.2 µg/ml, rifampicine (RIF) 40.0 µg/ml, éthambutol (EMB) 2.0 µg/ml, éthionamide (ETH) 40.0 µg/ml et kanamycine (KAN) 20.0 µg/ml.

La sensibilité de la souche a été estimée par détermination de proportion de bacilles résistants à l'antibiotique spécifique en comparaison avec la croissance spécifique du témoin. Les proportions critiques sont 1% pour INH, SM, RIF, et EMB et 10% pour ETH et KAN (30). Les résultats des tests de sensibilité de ces souches sont résumés dans les tableaux I, II et III.

Tableau I, II & III..

Profil de résistance de 22 souches isolées de patients ayant une relation de parenté.		15 souches isolées de patients n'ayant aucun lien de parenté.	
souches isolées de patients en relation épidémiologique	résistance aux antibiotiques	groupe	isolat clinique résistance aux antibiotiques
2	INH	I	4
15	-		18
17	INH, SM, RIF, ETH	II	3
27	INH, SM, RIF, ETH		6
11	INH, SM, RIF	III	10
35	ETH		20
32	INH, ETH		P26
33	INH, RIF, KAN	IV	24435
34	INH, RIF, ETH		36
9	INH	V	E527
24	INH, RIF		23
19	INH	VI	26
29	INH, RIF		31
16	-		14
30	-		25
313	0	6 souches de <i>M. tuberculosis</i> isolées de patients n'ayant aucun lien de parenté.	
293	0	isolat clinique	résistance aux antibiotiques
405	0	7	-
E243	INH, SM	8	-
E145	INH, SM	13	-
E293	INH, SM	21	0
E334	KAN	22	SM
		28	-

Abréviations: INH : isoniazide, RIF : rifampicine, SM : streptomycine, PZA : pyrazinamide, ETH : éthionamide, EMB : éthambutol, KAN : kanamycine. - : antibiogramme non fait. 0 : sensible à tous les antituberculeux.

### Obtention d'ADN mycobactérien

Les souches isolées de *M. tuberculosis* ont été mises en suspension dans 5 ml de milieu Middlebrook 7H9 supplémenté avec de la catalase d'albumine dextrose (Difco) contenant 1,4 % de glycine, 6.10<sup>-3</sup> M EDTA et 0,05% de Tween 80. D cyclo-sérine (Sigma) et lysozyme (Sigma) ont été rajoutés à une concentration finale de 1 mg/ml et 2 mg/ml, respectivement. La culture a été incubée toute la nuit avec agitation à 37°C et chauffée à 80°C pendant 20 mn. Les bactéries ont été centrifugées pendant 30 mn à 3000g et remises en suspension dans 0,5 ml TEN (0,05M Tris HCl, 0,05M EDTA, 0,1M NaCl) pH8. Ensuite 12 µl de SDS 25% et 9 µl de protéinase K (Boehringer) à 125 mg/ml ont été rajoutés et le mélange a été incubé à 37°C pendant 18 heures. L'extraction d'ADN mycobactérien a été faite ensuite au phénol chloroforme et la précipitation dans l'éthanol à -20°C toute la nuit. Après centrifugation pendant 30 mn à 0°C, le lavage a été fait à 70 % d'éthanol et le culot séché dissout dans 50 µl de tampon TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA).

### Hybridation.

**Sondes** - La première sonde d'IS 6110 a été préparée par PCR en utilisant les amorces INS1 et INS 2 (28) synthétisées dans notre laboratoire par un synthétiseur d'ADN de type 391 (Applied Biosystems). La réaction d'amplification a été faite dans un volume total de 100 µl contenant 50 mM KCl, 10 mM Tris -HCl pH 8,8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq polymérase, 1,5 µM de chaque oligonucléotide, 200 mM de chaque dNTP et 1 µl d'ADN extrait au TE-triton à partir de la souche H37Rv. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Perkin-Elmer, USA) suivant un programme de 1 mn à 95°C, 1 mn à 55°C et 1 mn à 70°C, ceci pendant 40 cycles. Le produit d'amplification a été purifié, précipité à l'éthanol et marqué à la peroxydase (Kit ECL Amersham).

La deuxième sonde pMTO2 provenant du laboratoire de pré-développement de sondes de l'Institut Pasteur de Paris (26) linéarisé par PstI est chimiquement marquée à l'acétoxy acétyl aminofluorène (AAF) comme décrit précédemment (8, 25, 26). La détection de cette sonde après hybridation se fait à l'aide de l'anticorps de souris antiAAF et l'anticorps anti-souris marqué à la phosphatase alcaline (Biosys, Compiègne, France).

### Digestion enzymatique, T ransfer t sur membrane, Hybridation et révélation

- Deux enzymes de restriction ont été utilisés. En effet, l'ADN mycobactérien isolé à partir du premier groupe de 10 souches est digéré à l'aide de l'enzyme de restriction PvuII pendant 18 heures (Boehringer). L'ADN digéré est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium. Les fragments d'ADN sont transférés par capillarité sur membrane Hybond N<sup>+</sup> (Amersham). L'hybridation est faite à l'aide de sonde marquée à la peroxydase et la détection selon le système ECL (Amersham). Par contre l'ADN extrait à partir du deuxième groupe de 33 souches est digéré avec l'enzyme de restriction PstI (Boehringer). Après transfert sur membrane de nitrocellulose, l'hybridation avec pMTO2 linéarisé et marqué à l'AAF a été révélée comme décrit précédemment (28).

## Résultats

Dans cette étude, 43 isolats cliniques de *M. tuberculosis* - *losis* ont fait l'objet d'une étude de typage moléculaire par la technique classique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction RFLP associée à la séquence d'insertion IS 6110 pour une surveillance épidémiologique de la tuberculose.

L'analyse des profils de restriction des fragments suivie d'hybridation montre un nombre

variable de copies d'IS 6110 allant de 1 à 17 copies comme illustré dans le tableau IV. Une seule souche montre une seule copie (fig 1) tandis qu'une autre montre plus de 17 copies (fig 2).

Des isolats séquentiels [9, 24] et [19, 29] isolés de deux patients ayant acquis une résistance à la rifampicine montrent des profils RFLP hybridés à l'IS 6110 identiques (fig 1).

Les souches [16, 30] isolées respectivement à partir de crachat et de ponction nodulaire à des périodes différentes d'un même patient montrent un même polymorphisme (fig 1). Les souches [32, 33, 34] isolées de patients travaillant dans la même usine montrent des profils RFLP identiques (fig 1).

Les mêmes résultats sont observés avec les souches [2, 15] isolées de deux frères avec une différence d'une seule bande.

Les souches [313, 405, 293] isolées de 3 membres d'une même famille montrent un même polymorphisme avec déficit de 3 copies d'IS 6110 (fig 2) pour la souche [405].

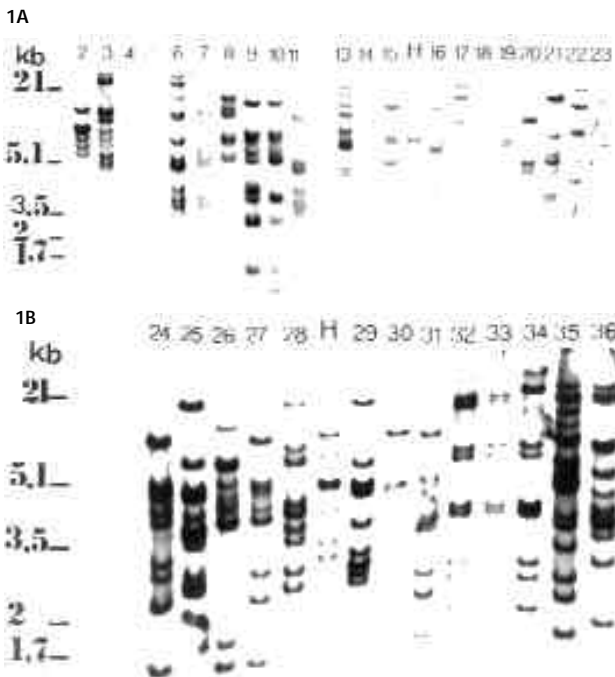
L'étude de multiples isolats cliniques présentant des profils de résistance identiques a montré que le groupe I (tableau II) résistant à l'INH présente des profils RFLP hybridés à l'IS 6110 différents. Les mêmes résultats sont observés avec les groupes II, III, IV, V et VI (tableau II) (fig 1 & 2).

Tableau IV.

Nombre de copies d'IS 6110 au niveau des 43 souches isolées.	
nb de copies d'IS 6110	nb de souches
1	1
5	1
7	4
8	7
9	13
10	5
11	5
12	2
13	1
14	1
15	2
17	1

Figure 1.

Profils RFLP de 33 souches de *M. tuberculosis* isolées de 30 patients, digérées par PstI et hybridées avec le plasmide pMTO2 linéarisé par PstI marqué à l'AAAF.



## Discussion

Dans notre étude, la majorité (70%) des souches de *M. tuberculosis* ont un nombre de copies variant entre 8 et 11 éléments IS 6110. Alors que la majorité des souches retrouvées en Polynésie française varient entre 4 et 13 copies (29), celles de Hong Kong varient entre 8 et 21 copies (6) et la plupart des souches africaines et européennes varient entre 6 et 15 éléments IS 6110 (31).

Cette étude rapporte aussi l'existence d'une souche comportant une seule copie d'IS 6110, comme cela a été illustré dans d'autres populations (7, 30).

Les isolats séquentiels [9, 24] et [19, 29] montrent des profils RFLP hybridés à l'IS 6110 identiques, même après l'acquisition d'une résistance à la rifampicine suite d'un traitement inadéquat ou insuffisant : ceci indique qu'il s'agit de réactivations d'anciennes lésions et non d'une réinfection. Or, le développement de la résistance à la rifampicine est dû à des mutations ponctuelles au niveau du gène d'ARN-polymérase et n'entraînent pas par conséquent de changement au niveau des profils RFLP, à moins qu'il n'y ait introduction d'un nouveau site de restriction PstI. La stabilité des profils RFLP hybridés à l'IS 6110 avec acquisition d'une résistance à la rifampicine a été aussi rapportée dans la littérature (11).

Les souches [16, 30] isolées de deux sites différents d'un même patient montrent un même polymorphisme : ainsi les sites chromosomiques de l'IS 6110 ne dépendent pas de la localisation de l'infection. Ceci exclut l'existence d'un tropisme vers un type d'organe comme cela a été indiqué dans certaines études (24).

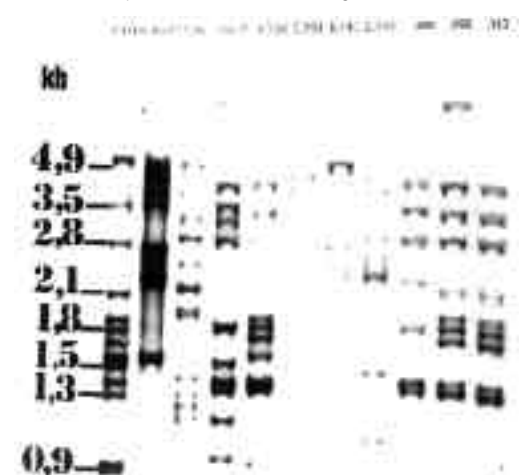
Les souches [32, 33, 34] isolées de patients travaillant dans la même usine ont montré des profils identiques présumant une source de contamination commune. Les souches [2, 15] et [313, 293, 405] présentent des profils RFLP hybridés à l'IS 6110 similaires. Ceci montre une même source d'infection et a été illustré dans plusieurs études (2, 7, 9, 10, 13, 17, 19, 29). Le déficit de 3 bandes au niveau de la souche [405] est dû probablement à un phénomène de transposition répllicative de l'IS 6110. Ce phénomène de transposition est en accord avec les résultats de plusieurs études (7, 28).

L'étude de multiples isolats cliniques présentant des profils de résistance identiques a montré l'absence de corrélation entre les profils de restriction de fragments hybridés à l'IS 6110 et

Figure 2.

Profils RFLP de 10 souches de *M. tuberculosis* isolées de 10 patients, digérées par PvuII et hybridées avec un fragment de 201pb de l'élément IS 6110 marqué à la peroxydase.

Les tailles (en paires de kilobases) des fragments d'ADN de H37Rv.



la résistance aux antibiotiques. Les mêmes résultats ont aussi été rapportés dans de nombreuses études (28, 29). Actuellement, plusieurs variétés de marquage non radioactif sont commercialisés. En comparant la quantité d'ADN utilisée dans les deux types de marquage chimique (de l'ordre du picogramme) ou enzymatique (de l'ordre du nanogramme) et le type de détection colorimétrique ou par chimioluminescence, les résultats sont très discriminants. Ceci serait d'un grand intérêt à pratiquer en routine dans les laboratoires n'utilisant pas les radio-isotopes. Les perspectives de ce travail sont envisagées par l'analyse systématique de souches résistantes isolées de patients nouveaux cas et chroniques dans le but de détecter la transmission de ces souches entre des groupes sociaux adjacents et construire une banque de données pour des comparaisons ultérieures entre laboratoires.

## Conclusion

L'IS 6110 reste un bon marqueur épidémiologique de la tuberculose, car il permet de distinguer entre rechute et réinfection et également d'identifier les sources d'infection.

## Références bibliographiques

1. BECK-SAGUE C, DOOLEY SW, HUTTON MD, OTTEN J, BRUDEN A *et al.*- Hospital outbreak of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. *J Am Med Assoc*, 1992, **268**, 1280.
2. CAVE MD, EISENACH KD, MAC DERMOT PF, BATES JH & CRAWFORD JT - IS 6110 conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilisation in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* 1991, **5**, 73-80.
3. COLLINS DM & STEPHENS DM - Identification of insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Letters*, 1991, **83**, 11-16.
4. CRAWFORD J & BATES JH - Phage typing of mycobacteria. In : KUBICA J & WAYNE LG Eds - *The mycobacteria: a sourcebook (Part A)*. Marcel Dekker. New York., 1984, 123.
5. DAFFE M, PAPA F, LASZLO A & DAVID HL- Glycolipids of recent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: chemical characterization and immunoreactivity. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**, 2759-2766.
6. DAS D, CHAN SL, ALLEN BW, MITCHINSON DA & LOWRIE DB - Application of DNA fingerprinting with IS 986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis patients in Hong Kong before, during and after short course chemotherapy. *Tubercle Lung Dis*, 1993, **74**, 47-51.
7. DELLAGI DC, ABDERAHMAN A, HALTITI R, KOUBAJI H, GICQUEL B & DELLAGI K - Large scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 2446-2450.
8. FUCHS R & DAUNE M - Physical studies on desoxyribonucleic acid after covalent binding of a carcinogen. *Biochemistry*, 1972, **11**, 2659-2666.
9. GENEWEIN A, TELENTI A, BERNASCONI C, MORDASINI C, WEISS S *et al.*- Molecular approach to identifying route transmission of tuberculosis in the community. *Lancet*, 1993, **342**, 841-844.
10. GODFREY-FAUSSETT P, MORTIMER PR, JENKINS PA & STOKER NG - Evidence of transmission of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Br Med J*, 1992, **305**, 221-223.
11. GODFREY-FAUSSETT P, STOKER NG, SCOTT JAG, PASVOL G, KELLY P & CLANCY L - DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* do not change during the development of rifampicin resistance. *Tubercle Lung Dis*, 1993, **74**, 240-243.
12. HAAS WH, BUTLER WR, WOODLEY C.L & CRAWFORD JT - Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 1293-1298.
13. HERMANS PWM, VAN SOOLINGEN D, DALE JW, SCHUITEMA ARJ, Mc ADAM RA *et al.*- Insertion element IS 986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**, 2051-2058.
14. JONES WD & KUBICA GP- Fluorescent antibody techniques with mycobacteria. III. Investigation of the five serological homogeneous groups of mycobacteria. *Zentralblatt Bakteriell (Orig A)*, 1968, **207**, 58-62.
15. KLEEBERG HH, KOORNHOF HJ & PALMHERT H - Laboratory manual of tuberculosis methods. 2nd ed. revised by NEL EE, KLEEBERG HH, GATNER EMS. Pretoria: TBRI, *Bakteriell Orig*, 1980, **A 207**, 58-62.
16. LINTON CJ, JALAL H, LEEMING JP & MILLAR MR - Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**, 2169-2174.
17. MAZUREK GH, CAVE MD, EISENACH KD, WALLACE RJ, BATES TH & CRAWFORD JT - Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**, 2030-2033.
18. Mc ADAM RA, HERMANS PWM, VAN SOOLINGEN D, ZAINUDI ZF, CATTY D *et al.*- Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol*, 1990, **4**, 1607-1613.
19. OTAL I, MARTIN C, VINCENT-LEVY-FRÉBAULT V, THIERRY D & GICQUEL B - Restriction fragment length polymorphism analysis using IS 6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**, 1252-1254.
20. PALITTAPONGARNPIM P, CHOMYIC S, FANNING A & KUNIMOTO D - DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**, 761-762.
21. PLIKAYTIS BB, MARDEM JL, CRAWFORD JT, WOODLEY CL, BUTLER WR & SHINNICK TM - Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**, 1542-1546.
22. ROSS BC & DWYER B - Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 329-334.
23. ROMAN MC & SICILIA MJL - Preliminary investigation of *Mycobacterium tuberculosis* biovars. *J Clin Microbiol*, 1984, **20**, 1015-1016.
24. SMALL PM & MOSS A - Molecular epidemiology and the new tuberculosis. *Infect Agents Dis*, 1993, **2**, 132-138.
25. TCHEN P, FUCHS RPP, SAGE E & LENG M - Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**, 3466-3470.
26. THIERRY D, BRISSON NOEL A, VINCENT-LEVY-FRÉBAULT V, NGUYEN S, GUESDON JL & GICQUEL B - Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**, 2668-2673.
27. THIERRY D, CHAVAROT P, MARCHAL G, THI KT LE, HO ML *et al.*- *Mycobacterium tuberculosis* strains unidentified using the IS 6110 probe can be detected by oligonucleotides derived from the Mt308 sequence. *Res Microbiol*, 1995, **146**, 325-328.
28. THIERRY D, MATSIOTA-BERNARD P, PITSOUNI E, COSTOPOULOS C & GUESDON JL - Use of the insertion element IS6110 for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates presenting various profiles of drug susceptibility. *FEMS Immunol Medical Microbiol*, 1993, **6**, 287-298.
29. TORREA G, LEVEE G, GRIMONT P, MARTIN C, CHANTEAU S & GICQUEL B - Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 1899-1904.
30. VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PEW, HERMANS PWM, GROENEN PMA & VAN EMBDEN JDA - Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 1987-1995.
31. VAN SOOLINGEN D, HERMANS PWM, HASS PEW, SOLL DR & VAN EMBDEN JDA - Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence dependent polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**, 2578-2586.
32. WAYNE LG - Numerical taxonomy and cooperative studies: roles and limits. *Rev Infect Dis*, 1981, **3**, 822-828.
33. Yuen LKW, ROSS BC, JACKSON KM & DWYER B - Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. *J Clin Microbiol*, 1993, **33**, 1615-1618.