

JOURNÉE “GÉNÉTIQUE ET MALADIES INFECTIEUSES”

Épidémiologie moléculaire des grandes endémies bactériennes dans l’Afrique sub-saharienne.

B. Picard

Laboratoire de bactériologie-virologie, Faculté de médecine de Brest, France.

Journée SPE du 13 octobre 1999 à l’Institut Pasteur à Paris : “Génétique et maladies infectieuses dans l’environnement tropical”. *

Summary: Molecular epidemiology of endemic bacterial infections in Sub-Saharan Africa.

Over the past decades, the differentiation of bacterial strains for epidemiological purposes has been based on conventional phenotypic characters. More recently, methods studying the directly coded molecules or semantides (nucleic acids or proteins) have allowed, concomitantly with the technical progresses of electrophoresis, the description of stable, discriminant, reproducible markers, which were applicable to large series of isolates. Initially applied to study nosocomial infections in industrialised countries, these methods appear to be particularly suitable for an approach of the epidemiology of endemic bacterial infections in sub-Saharan Africa. The fact that these tools remain costly and technically complicated explains that most of these studies are conducted in the laboratories of industrialized countries.

This research reveals the epidemiological complexity of most of these infections. Thus, the epidemiology of trachoma was studied by the analysis of polymorphism of the major outer membrane protein gene of Chlamydia trachomatis in a village of Gambia. A PCR based technique was used to determine the frequency of infection in symptomatic and clinically negative subjects and to specify the prevalence of the genotypes.

The epidemiology of plague was studied by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the ribosomal RNA genes (ribotyping). Distinct ribotypes differentiated the strains of the first two pandemics from the third one. The strains of African origin were particularly heterogeneous, especially in Kenya. This diversity may be explained by the fact that the plague focus is extremely ancient in Central Africa.

Bacterial agents of meningitis were also studied. The electrophoretic polymorphism of outer membrane proteins of Haemophilus influenzae of b type was used to specify the epidemiology of meningitis in Gambia. The invasive strains exhibited distinct profiles from non-invasive strains. Different types were evidenced in the west, east and central parts of the country. The antigenic polymorphism of outer membrane proteins of Neisseria meningitidis allowed the differentiation of the strains isolated in Mali according to the period of isolation. Thus, the endemic strains of A serotype were distinguished from those belonging to the same serotype, which were responsible for the 1994 epidemic.

Several molecular methods were applied to the typing of Vibrio cholerae strains, particularly those of the seventh pandemic. The enzyme electrophoretic polymorphism (MLEE), a technique based on RFLP analysis of toxin genes, the arbitrarily primed PCR (AP-PCR) and mainly the ribotyping were applied. This last method revealed that in Africa several clones of V. Cholerae El Tor were responsible for the seventh pandemic. Moreover the technique has evidenced the intercontinental spread of a clone of V. Cholerae isolated in 1993 in Calcutta and identified a year later in Guinea-Bissau.

Tuberculosis is at present the first opportunistic infection linked to HIV infection in sub-Saharan Africa. Tuberculosis incidence is particularly high and is expected to increase. Several molecular methods, including IS 6110 RFLP analysis, AP-PCR and spoligotyping were used to study the epidemiology of tuberculosis in various countries: South Africa, Tanzania, Zimbabwe, Kenya and Malawi. The aims of this research varied: prevalence of reactivation and of recently acquired infections, routes of contamination, degree of genetic diversity of the organisms isolated in a given geographic area, urban and rural origins of the infections, comparison of isolates from HIV seropositive and HIV seronegative patients. Identical profiles in the strains isolated from several patients could correspond to clusters of infections. However, the identification of epidemiological links in most clusters is hard to obtain.

As for nosocomial infections in industrialised countries, these studies, using discriminant molecular tools, demonstrated the epidemiological complexity of these infections in sub-Saharan Africa and have led to the reconsideration of classical models. This research will be useful in the future to optimize prophylactic measures and design new vaccinal strategies.

epidemiology
molecular marker
bacteria
Sub-Saharan Africa

Résumé :

En épidémiologie, la différenciation des souches bactériennes a longtemps été basée sur des caractères phénotypiques conventionnels. L'apparition de méthodes étudiant les molécules directement codées ou sémantides (acides nucléiques et protéines) a permis, avec les progrès techniques, notamment de l'électrophorèse, de décrire des marqueurs stables, discriminants, reproductibles et applicables à de larges séries de souches. Initialement appliqués à l'étude des infections nosocomiales des pays industrialisés, leurs qualités les rendent particulièrement utiles à l'approche épidémiologique des infections bactériennes endémiques sévissant en Afrique sub-saharienne. Le caractère onéreux et techniquement lourd de ces outils moléculaires a amené les auteurs à conduire fréquemment ces travaux dans les laboratoires des pays industrialisés. Encore ponctuels dans plusieurs domaines, ils mettent en évidence la complexité épidémiologique de la plupart de ces infections.

L'épidémiologie du trachome a été abordée par l'analyse du polymorphisme du gène de la protéine majeure de la membrane externe de *Chlamydia trachomatis*, dans un village de Gambie. Une technique de PCR a permis de déterminer la fréquence de l'infection des sujets symptomatiques et asymptomatiques et de préciser la répartition des génotypes.

L'épidémiologie de la peste a été étudiée par l'analyse du polymorphisme de restriction des gènes codant l'ARN ribosomique (ribotypage). Des ribotypes distincts ont différencié les souches des deux premières pandémies de celles de la troisième. Les souches d'origine africaine ont été particulièrement hétérogènes, principalement au Kenya où leur diversité pourrait correspondre à l'ancienneté de l'endémie.

Les agents bactériens responsables de méningites ont également été étudiés. Le polymorphisme électrophorétique des protéines de la membrane externe de *Haemophilus influenzae* du type b a été utilisé pour préciser l'épidémiologie des méningites dues à cet agent en Gambie. Les souches invasives ont présenté des profils distincts de ceux des souches non invasives. Des types différents ont également été mis en évidence en fonction des régions ouest, centrale et est du pays. Le polymorphisme antigénique des protéines de membrane externe de *Neisseria meningitidis* a permis de différencier les souches provenant du Mali en fonction de l'époque de leur isolement. Ainsi, les souches endémiques du sérotype A ont été distinguées des souches de même sérotype responsables d'une épidémie en 1994.

Plusieurs méthodes moléculaires ont été appliquées au typage des souches de *Vibrio cholerae*. À côté du polymorphisme électrophorétique des enzymes (MLEE), les techniques analysant le polymorphisme des gènes de la toxine, la PCR au hasard (RAPD), et surtout le ribotypage, ont été appliquées. Cette dernière technique a permis de montrer qu'en Afrique, plusieurs clones de *V. cholerae* El Tor étaient impliqués lors de la 7ème pandémie. Elle a également conduit à mettre en évidence la diffusion de clones d'un continent à l'autre. Ainsi, un clone de *V. cholerae* apparu en 1993 à Calcutta pouvait être identifié, un an plus tard, en Guinée Bissau.

La tuberculose constitue, en Afrique sub-saharienne, la principale infection opportuniste liée à l'infection par le VIH. Son incidence particulièrement élevée est en constante augmentation. Plusieurs méthodes moléculaires, notamment le polymorphisme de restriction de la séquence d'insertion IS6110, la PCR au hasard et une technique d'hybridation sur membrane, le spoligotyping, ont été mis en œuvre pour étudier l'épidémiologie tuberculeuse dans plusieurs pays : Afrique du Sud, Tanzanie, Zimbabwe, Kenya, Malawi. Les objectifs de ces travaux étaient divers : estimation de la prévalence des réactivations et des infections récentes, caractérisation des modes de contamination, comparaison de la proximité génétique des souches avec la proximité géographique des cas d'infections, différenciation des souches d'origine urbaine ou rurale et de celles isolées des patients atteints ou non du sida. Des profils identiques des souches de plusieurs malades peuvent correspondre à des foyers épidémiques. S'ils caractérisent des infections récentes, les liens épidémiologiques entre les patients sont, dans la plupart des cas, difficiles à objectiver.

L'ensemble de ces études, en utilisant des marqueurs de souches discriminants, a mis en évidence la complexité épidémiologique des infections et a conduit à revoir les schémas classiquement admis. Elles permettront, à terme, d'optimiser les mesures prophylactiques à mettre en œuvre et de préciser, dans certains cas, les stratégies vaccinales.

Introduction

En pathologie infectieuse, toute interprétation épidémiologique n'est possible que si l'on dispose d'un marquage précis et discriminant des souches bactériennes.

Les techniques conventionnelles de typage présentent certains inconvénients. Ainsi, sérotypage et lysotypage ne peuvent souvent être effectués que par des centres de référence disposant des antisérums et des batteries de bactériophages. Le biotypage est plus accessible mais non toujours discriminant. De plus, ces marqueurs phénotypiques se rapportent à une structure ou à une ou plusieurs propriétés physiologiques, mais ils sont soumis à une variabilité dans la présence ou dans l'expression de ces molécules.

Les techniques moléculaires étudient les sémantides (acides nucléiques ou protéines). Ces molécules représentent des mar-

queurs plus stables car de contrôle génétique direct. De plus, elles rendent compte des distances phylogénétiques entre les bactéries résultant de leur divergence au cours des générations et permettent d'estimer ces distances. Ceci conduit à une approche plus raisonnée d'un problème épidémiologique. Dans un premier temps, ces marqueurs moléculaires furent utilisés dans les pays industrialisés pour l'approche épidémiologique des infections nosocomiales. Cependant, leur pouvoir discriminant important, leur reproductibilité et leur application possible à de très grandes séries de souches en firent des outils particulièrement indiqués pour l'approche épidémiologique des endémies bactériennes dans les pays en voie de développement et en particulier en Afrique sub-saharienne. Mais, dans les premières études, dès le début des années 1990, leur coût onéreux et la lourdeur de leur mise en œuvre limitèrent leurs applications aux laboratoires des pays industrialisés.

Nous allons voir comment l'utilisation de ces marqueurs moléculaires a permis de nouveaux éclairages sur les schémas épidémiologiques de plusieurs infections bactériennes endémiques sévissant en Afrique sub-saharienne.

Trachome

L'éradication du trachome est rendue difficile par les connaissances limitées sur la transmission de *Chlamydia trachomatis*.

La technique phénotypique conventionnelle de typage, le sérotypage, est difficile à mettre en œuvre dans les pays en voie de développement car elle nécessite une culture préalable qui est délicate chez les *Chlamydia*.

La détection de l'ADN de *C. trachomatis* par PCR ne nécessite pas de culture préliminaire. L'amplification génique du gène de la protéine majeure de membrane externe (MOMP) a été mise en œuvre pour étudier l'épidémiologie du trachome dans le village de Jali, en Gambie, où cette infection est endémique (8). La PCR a permis de détecter *C. trachomatis* chez 51 % des sujets présentant des signes cliniques de trachome et 5 % de sujets asymptomatiques.

Le produit de la première PCR a été utilisé dans une seconde qui, à l'aide de trois amorces spécifiques de trois génotypes, A, B et C, a permis leur caractérisation. Le génotype A a été détecté dans 41 cas et le B dans 12 cas et des infections mixtes A - B ont été mises en évidence. De plus, par séquençage direct de certaines séquences chez 14 sujets, trois sous-types de génotype A et deux sous-types de génotype B ont été mis en évidence.

Peste

Trois pandémies se sont succédé dans l'histoire de la peste : la peste de Justinien, au VI^{ème} siècle, la peste noire au XIV^{ème} siècle et la troisième et actuelle, qui débuta dans le Yunnan et atteignit Hongkong en 1894. Le développement des transports modernes favorisa son extension.

Actuellement, la peste n'est pas éradiquée et des foyers endémiques persistent en Afrique sub-saharienne: à Madagascar, en Tanzanie, au Kenya, au Zaïre, au Botswana et en Ouganda. Longtemps, la possibilité de différencier les souches de *Yersinia pestis* a été limitée par l'homogénéité phénotypique de cette bactérie caractérisée par un seul sérotype, un seul lysovar et trois biovars.

GUYOULE *et al.* ont développé un système de typage basé sur l'analyse du polymorphisme de restriction des gènes codant l'ARN ribosomique (6). Cette technique qui a été appliquée au typage de nombreuses espèces bactériennes (5), et notamment à d'autres *Yersinia* (11), présente l'avantage d'un important pouvoir discriminant et d'une bonne stabilité, permettant des comparaisons inter-laboratoires.

Les auteurs ont étudié 70 souches dont 26 d'origine africaine. Quarante-six souches se sont réparties en deux ribotypes: B et O. Une corrélation entre le ribotype O et les biovars *Medialis* et *Antiqua* a été établie. Les deux premières pandémies seraient donc dues à des souches de ce ribotype. La souche initiale présentant un biovar *Antiqua* se répandit d'Asie centrale à l'Afrique centrale et fut responsable de la peste de Justinien. Plus tard, un variant de ce clone, du biovar *Medialis*, était responsable de la peste noire.

Le clone responsable de la troisième pandémie présente un second ribotype principal, B. Il dériverait du clone du ribotype O dont il est très proche.

Les 24 souches présentant la plus grande hétérogénéité se sont réparties dans 14 autres ribotypes. Elles proviennent majoritairement d'Afrique, notamment du Sénégal, du Zaïre et surtout du Kenya. La plus grande diversité a été mise en évidence dans ce pays où 8 ribotypes ont été détectés parmi 15 souches. Celles-ci sont presque toutes du biovar *Antiqua*, ce qui correspond au caractère très ancien de la peste en Afrique Centrale. Leur diversité pourrait traduire une divergence clonale locale qui aurait eu le temps de se développer.

Epidémiologie des méningites bactériennes

Haemophilus influenzae

En Gambie, l'incidence de la méningite à *H. influenzae* est de 297 cas pour 100 000 enfants de moins d'un an. Ces infections surviennent tôt, en moyenne à cinq mois. Elles sont dues au sérotype b de cette espèce.

À côté des techniques phénotypiques de sérotypage et de biotypage, un marquage épidémiologique des souches par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des protéines de la membrane externe a été proposé (1, 15).

Cette technique a été appliquée à l'étude épidémiologique des méningites à *H. influenzae* sérotype b en Gambie. Cent soixante-six souches ont ainsi été comparées. Elles étaient isolées de 102 cas de méningites survenues dans les parties ouest et centrale du pays. Soixante-quatre souches étaient isolées du pharynx de porteurs sains vivant dans l'ensemble du pays, incluant la région est.

La comparaison des profils des souches avec celles isolées d'autres régions du monde (2) a montré que les souches de Gambie étaient distinctes.

Les souches invasives ont présenté des profils différents des souches non invasives. De plus, parmi ces dernières, la distribution de deux types électrophorétiques a été corrélée à l'origine géographique des sujets. Ainsi, les souches d'un type prédominaient dans les régions ouest et centrale alors que celles d'un autre type étaient isolées dans la région est.

Ces résultats épidémiologiques peuvent permettre d'orienter une stratégie vaccinale. Le caractère distinct des souches isolées en Gambie doit sans doute être pris en compte pour interpréter l'efficacité d'une vaccination effectuée à partir de souches de collection d'autres provenances. En cas d'échec, un vaccin différent pourrait alors être préparé à partir des clones invasifs isolés localement.

Neisseria meningitidis

Le Mali est un pays où sévit à l'état endémique la méningite cérébro-spinale. Il a connu de 1939 à 1994 sept grandes épidémies à *Neisseria meningitidis* du séro groupe A. Mais de 1988 à 1993, le séro groupe C a supplanté le séro groupe A, qui est reparu en 1994, causant une épidémie.

Une analyse épidémiologique a été menée sur 570 souches de *Neisseria* isolées de 1989 à 1994. Les souches ont été comparées par l'analyse du polymorphisme antigénique des protéines de la membrane externe. Après électrophorèse et transfert, un "Western-blot" a été effectué à l'aide d'anticorps monoclonaux (10).

Cette analyse a confirmé la prédominance des souches du séro groupe C parmi celles isolées de 1989 à 1993. Pendant cette période, les souches du séro groupe A, minoritaires, ont été caractérisées par un type de protéines, P1-7 correspondant à un clone de méningocoque particulier, le clone IV-1.

Par contre, les souches du sérotype A, devenues majoritaires au Mali en 1994, ont présenté un autre type de protéines, P1-9, qui correspond à un clone distinct, III-1. Ce clone, responsable de l'épidémie de 1994, a été importé en 1987 à LaMecque par des pèlerins venant de Chine et du Népal, où il est apparu en 1982. Puis, lors du retour des pèlerins, il a été introduit au Soudan et au Tchad où il a été responsable d'épidémies en 1988. Il a atteint le Kenya et l'Éthiopie en 1989 et enfin le Mali en 1994.

Choléra

Depuis 1817, sept pandémies de choléra dues à *Vibrio cholerae* O1 se sont succédées. Les six premières, apparues en Inde dans la région du Bengale, étaient dues à *V. cholerae* biotype cholerae. La septième pandémie est apparue en 1961 en Indonésie ; *V. cholerae* biotype El Tor en est la cause.

De nombreuses méthodes de typage ont été développées pour différencier les souches de *V. cholerae*. Certaines, phénotypiques, incluent le sérotypage et le biotypage et différents schémas de lysotypage.

Parmi les techniques moléculaires, l'analyse du polymorphisme de restriction des gènes codant la toxine cholérique (*ctx*), le polymorphisme électrophorétique d'enzymes métaboliques (multilocus enzyme electrophoresis ou MLEE) ont été utilisés. La technique la plus fréquente est le ribotypage, initialement développé par KOBLAVI *et al.* (9) puis par POPOVIC *et al.* (12).

Le choléra est apparu en 1970 en Guinée, puis il s'est répandu en Afrique de l'Ouest où il est actuellement endémique et sporadique. En fait, plusieurs ribotypes ont été mis en évidence parmi les souches d'origine africaine, ce qui indique que plusieurs clones de *V. cholerae* El Tor sont impliqués dans la septième pandémie.

En 1986, une épidémie de choléra est apparue en Guinée Bissau, et elle atteignit la capitale, Bissau, en 1987. À la même époque, l'incidence du choléra augmentait au Sénégal. En octobre 1994, une seconde épidémie a atteint la Guinée Bissau et s'est prolongée en 1995. La maladie apparaissait également en juillet 1994 en Guinée.

Les souches isolées en Guinée Bissau lors des épidémies de 1987 et 1994-1995 ont été comparées par ribotypage et polymorphisme des gènes *ctx* de la toxine cholérique (3). Des ribotypes clairement distincts ont été obtenus pour les souches de chacune des deux épidémies qui sont donc dues à des clones différents.

En fait, l'origine de l'épidémie de 1994 a été retrouvée par SHARMA *et al.* (14). Ainsi, à Calcutta, en Inde, les souches de *V. cholerae* biotype El Tor ont été remplacées entre janvier et juin 1993 par celles de *V. cholerae* O139. Puis, à partir de juillet 1993, le biotype El Tor est à nouveau réapparu.

Les souches indiennes de 1993 ont été comparées à celles isolées en Guinée Bissau en 1994-1995 par ribotypage et électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Les mêmes ribotypes ont été caractérisés dans les deux séries de souches. Des pulstypes identiques ont été également détectés dans des souches des deux origines.

Ainsi, la transmission intercontinentale d'un clone de *V. cholerae* a été mise en évidence par l'utilisation de ces deux marqueurs moléculaires. Toutefois, si les souches de la septième pandémie ont mis dix ans, de 1961 à 1970, pour atteindre la Guinée, en 1993, les souches de Calcutta apparurent en Guinée Bissau en quelques mois.

Tuberculose

La tuberculose constitue en Afrique sub-saharienne la principale infection bactérienne liée à l'infection par le VIH. Son incidence particulièrement élevée est en constante augmentation. Ainsi, en 1994, 68 % des 5,6 millions de patients atteints par les deux affections vivent dans cette partie du monde (7). De ce fait, la tuberculose est l'infection qui a suscité le plus de travaux épidémiologiques mettant en œuvre des marqueurs moléculaires (4, 13, 16, 17).

Plusieurs techniques génotypiques ont été développées au cours de ces études pour typer les souches de *Mycobacterium tuberculosis*. La plus répandue est l'analyse du polymorphisme de restriction de la séquence d'insertion IS 6110. L'amplification au hasard (arbitrarily primed PCR, AP-PCR) (13) et une technique d'hybridation sur membrane, le spoligotyping, ont également été utilisées.

Les objectifs de ces travaux étaient divers : estimation de la prévalence des réactivations et des infections récentes, caractérisation des modes de contamination, comparaison de la proximité génétique des souches avec leurs origines géographiques, différenciation des souches d'origine urbaine et rurale.

YANG *et al.* ont comparé des souches de *M. tuberculosis* isolées de patients séropositifs pour le VIH et séronégatifs à Dar-Es-Salaam, en Tanzanie (17). Cent trente-quatre souches isolées de 68 malades séropositifs et 66 malades séronégatifs ont été caractérisées par le polymorphisme de restriction de la séquence d'insertion IS 6110. De plus, la sensibilité des souches vis-à-vis de plusieurs antibiotiques a été testée.

Cent cinq profils de restriction ont été mis en évidence parmi ces 134 souches. Les isolats provenant des malades séropositifs ont été aussi polymorphes que ceux des patients séronégatifs.

Plusieurs séries de patients ont présenté des souches identiques. Ceci peut correspondre à un foyer épidémique ou indiquer une transmission récente. La fréquence de ces séries a été identique chez les patients atteints ou non du sida. Par ailleurs, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre les types de profils de restriction des souches et le statut sérologique des patients.

Ainsi, dans cette étude, les clones de *M. tuberculosis* isolés chez les patients séropositifs pour le VIH n'ont pas été distinguables de ceux des autres malades. De même, il n'a pas été trouvé de différence significative de niveau d'antibiorésistance en fonction du statut sérologique.

WILKINSON *et al.* (16) se sont attachés à étudier l'épidémiologie de la tuberculose dans un village rural du district Kwa Zulu/Natal, en Afrique du sud. Les souches de 246 patients ont ainsi été comparées par le polymorphisme de restriction de l'IS 6110. Les souches présentant des profils identiques, donc de même génotype, ont permis de définir des foyers infectieux. Ainsi, 29 % des patients se sont regroupés dans ces foyers infectieux, ce qui confirme le caractère récent de ces cas de tuberculose. Le polymorphisme des souches des autres patients permet d'émettre l'hypothèse d'une réactivation. Le cas index n'a pu être retrouvé que dans 14% des cas d'infection en foyer.

Ces résultats ont été comparés à un score classant les probabilités de contact et donc de transmission et allant de 0 (aucun contact); 1 (contact non établi mais possible); 2 (patients se connaissant mais contact épisodique) à 3 (patients fréquemment en contact ou vivant ensemble).

Douze pour cent des patients appartenant à quatre foyers infectieux ont présenté un score de type 3. Dans un de ces

cas, la transmission était nosocomiale. Pour deux autres foyers, un score de type 2 était établi et, dans deux autres cas, un score de type 1 était retenu. Mais, pour 70 % des malades appartenant à un foyer infectieux, aucun lien ne pouvait être défini.

Cette étude a confirmé l'important pouvoir discriminant de la technique moléculaire mise en œuvre sur des souches d'origine africaine. Cette capacité dépasse sans doute les possibilités de l'enquête épidémiologique de terrain dans la mesure où, par exemple, plusieurs cas index ont sans doute été diagnostiqués et soignés hors de l'enquête et où des contacts interhumains courts ou fortuits ont échappé à l'investigation. Elle montre, toutefois, que l'analyse épidémiologique de l'endémie tuberculeuse dans un village africain peut être menée et apporter un éclairage intéressant sur la transmission de cette infection.

Conclusion

L'utilisation, encore préliminaire, des marqueurs moléculaires a déjà permis de reconsidérer certains schémas épidémiologiques des endémies bactériennes en Afrique sub-saharienne.

La démonstration de la diffusion intercontinentale de clones bactériens a été établie.

L'approche de la distance phylogénétique entre les souches, irréalisable avec les marqueurs phénotypiques, a conduit à émettre des hypothèses intéressantes sur l'émergence des clones d'une pandémie de peste à l'autre et sur leur divergence en fonction du temps.

Enfin, les relations hôte infecté par le VIH et bacille tuberculeux ont pu être abordées avec précision.

Références bibliographiques

1. BARENKAMP SJ, MUNSON RS & GRANOFF DM - Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profiles. *J Infect Dis*, 1981, **143**, 668-676.
2. BIJLMER HA, VAN ALPHEN L, GEELEN-VAN DEN BROEK L, GREENWOOD BM, VALKENBURG HA & DANKERT J - Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b in Gambia. *J Clin Microbiol*, 1992, **30**, 386-390.
3. DALSGAARD A, MORTENSEN HF, MOLBACK K, DIAS F, SERICHANTALERS O & ECHEVERRIA P - Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated during cholera outbreaks in Guinea-Bissau. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 1189-1192.
4. GODFREY-FAUSSETT P & STOKER NG - Aspects of tuberculosis in Africa. 3 genetic "fingerprinting" for clues to the pathogenesis of tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1992, **86**, 472-475.
5. GRIMONT F & GRIMONT PAD - Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur/Microbiol*, 1986, **137 B**, 165-175.
6. GUIYOULE A, GRIMONT F, ITEMAN I, GRIMONT PAD, LEFEVRE M & CARNIEL E - Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**, 634-641.
7. HARRIES AD - Tuberculosis in HIV infected persons with special emphasis on sub-saharan Africa. *J Infect*, 1998, **37**, 205-209.
8. HAYES LJ, BAILEY RL, MABEY DCW, CLARKE IN, PICKETT MA *et al.* - Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from a trachoma endemic village in the Gambia by a nested polymerase chain reaction: identification of strain variants. *J Infect Dis*, 1992, **166**, 1173-1177.
9. KOBLAVI S, GRIMONT F & GRIMONT PAD - Clonal diversity of *Vibrio cholerae* O1 evidences by rRNA gene restriction patterns. *Res Microbiol*, 1990, **141**, 645-657.
10. KOUMARÉ B, ACHTMAN M, BOUGOUDOGO F, CISSE M & WANG JF - Epidémiologie moléculaire de la méningite à méningocoque au Mali; isolement d'un nouveau variant (P1.y) de la protéine de classe 1. *Bull OMS*, 1996, **74**, 375-379.
11. PICARD-PASQUIER N, PICARD B, HEERALAL S, KRISHNAMOORTHY R & GOULLET Ph - Correlation between ribosomal DNA polymorphism and electrophoretic enzyme polymorphism in *Yersinia*. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**, 1655-1666.
12. POPOVIC T, BOPP CA, OLSVIK & ET WACHSMUTH K - Epidemiologic application of standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 2474-2482.
13. RICHNER SM, MEIRING J & KIRBY R - A study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in the Eastern province of South Africa using random amplified polymorphic DNA profiling. *Electrophoresis*, 1997, **18**, 1570-1576.
14. SHARMA C, GHOSH A, DALSGAARD A, FORSLUND A, GHOSH RK *et al.* - Molecular evidence that a distinct *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strain in Calcutta may have spread to the African continent. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 843-844.
15. VAN ALPHEN L, GEELEN L, JONSDOTTIR K, TAKALA AK, KAYHTY H & ZANEN HC - Distinct geographical distribution of subtypes of *Haemophilus influenzae* b in Western Europe. *J Infect Dis*, 1987, **156**, 216-218.
16. WILKINSON D, PILLAY M, CRUMP J, LOMBARD C, DAVIES GR & STURM AW - Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Trop Med Internat Health*, 1997, **2**, 747-753.
17. YANG ZH, MTONI I, CHONDE M, MWASEKAGA M, FUURSTED K *et al.* - DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 1064-1069.