

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

## Identificação molecular pelo método de *Spoligotyping* de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Hospital Fernando Fonseca

### Molecular identification using Spoligotyping of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from the Hospital Fernando Fonseca

SUZANA DAVID\*, CLARA PORTUGAL\*\*, ABÍLIO ANTUNES\*\*\*, ÂNGELA CARDOSO\*, ANA CALADO\*, VANESSA BARROS\*, LUÍSA SANCHO\*\*

#### RESUMO

O *Spoligotyping* foi utilizado na genotipagem de 219 isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* de doentes do Hospital Fernando Fonseca. Esta técnica, baseada na metodologia PCR, analisa uma região cromossómica específica do complexo *M. tuberculosis*, o locus DR (*Direct Repeats*).

#### ABSTRACT

Spoligotyping was used in the genotyping of 219 isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, from patients of the Hospital Fernando Fonseca. This technique, based on PCR methodology, analyses a region of the chromosome specific of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, the DR locus

\* Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Micobacteriologia,

Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)/Universidade Nova de Lisboa (UNL).

\*\* Laboratório de Bacteriologia, Hospital Fernando Fonseca, Amadora.

\*\*\* UEI de Clínica e Doenças/IHMT/UNL.

Recebido para publicação/Received for publication: 03.12.09

Aceite para publicação/Accepted for publication: 04.03.25

Com o auxílio de uma base de dados internacional, mostramos que 29,2 % dos *Spoligotypes* predominantes pertenciam à família LAM (*Latino-American Mediterranean*). A família LAM 9, com 12,3 %, deixou-nos atentos à possível importação da doença de populações oriundas da América do Sul, onde tem sido frequentemente detectada. Foram identificadas as famílias genotípicas T1 e Haarlem, com 6,4 % e 8,7 %, respectivamente, apresentando uma frequência do tipo Europeia. A família Beijing, representando 1,4 %, pode estar relacionada com um problema emergente no nosso país, relativo a uma recente imigração de populações asiáticas e da Europa Oriental.

Foram encontrados isolados com um *Spoligotype* do tipo *M. bovis* em elevada percentagem – 3,7 %. Na Europa, esta infecção é extremamente rara, podendo este resultado não decorrer da infecção por *M. bovis*, mas por *M. bovis* BCG (devido à vacinação ou eventuais terapias com base no BCG recombinante) ou *M. africanum* (face à proximidade das duas espécies).

Uma percentagem elevada dos *Spoligotypes* (21,4 %) não foi identificada pela base de dados.

Este estudo é o primeiro entre nós e poderá ser o ponto de partida para a criação de uma base de dados com importantes repercussões sobre o programa nacional de luta contra a tuberculose.

REV PORT PNEUMOL 2004; X (3): 195-204

**Palavras-chave:** Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Spoligotyping*, Portugal.

(Direct Repeat).

With the aid of an international database, we showed that the predominant *Spoligotypes* belonged to the LAM family (*Latino-American Mediterranean*), 29.2 %. The LAM 9 family, with 12.3 %, left us attentive to the possible import of the disease through populations from South America, where it has been frequently identified. The genotypic families T1 and Haarlem, with 6.4 % and 8.7 % respectively, represented a frequency typical to Europe. The Beijing family, with 1.4 %, may represent an emerging problem in our country due to recent immigration of Asian and Eastern European populations.

Isolates with a *Spoligotype* of the *M. bovis* type were found at a high percentage, 3.7 %. In Europe, this infection is extremely rare suggesting the result may not be due to *M. bovis* infection but to *M. bovis* BCG (due to vaccination or eventual recombinant BCG based therapies), or *M. africanum* (due to the proximity of the two species).

A high percentage of the *Spoligotypes* were not identified by the database, 21.4 %.

This is the first study of this type amongst us and may be the starting point for the creation of a data base with important consequences on the national program against tuberculosis.

REV PORT PNEUMOL 2004; X (3): 195-204

**Key-words:** *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Spoligotyping*. Portugal.

## INTRODUÇÃO

A distinção entre os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* não é uma simples curiosidade. Apesar do seu relacionamento genético, os membros do complexo *M. tuberculosis*, que inclui o *M. tuberculosis*, *M. bovis* (entre

os quais se encontra a estirpe vacinal *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti* e o *M. canetti*, diferem na sua epidemiologia<sup>1</sup>, na sua importância relativa à doença em humanos, na sua patogenicidade e virulência.

Em micobacteriologia, um “complexo” é um grupo de espécies semelhantes, cujo diagnóstico

diferencial é difícil e exige laboratórios diferenciados. Para além desta noção, existem graus de menor diferenciação, alguns dos quais são permitidos pelo relacionamento de marcadores genéticos, como é o caso de famílias de estirpes. Um exemplo é a família Beijing do *M. tuberculosis* que tem vindo a ser considerada um problema emergente em tuberculose devido a uma frequente associação à multirresistência (MDR). A estirpe “W”, responsável pelo surto devastador de tuberculose multirresistente em Nova Iorque nos anos 1990, pertence a esta família<sup>2</sup>. Estirpes da família Beijing têm sido identificadas em várias partes do mundo. Elas são altamente prevalentes na Ásia (como indica o nome Beijing - China) e nos países da antiga União Soviética<sup>3</sup>.

O “*Spacer oligonucleotide typing*” - *Spoligotyping*, é uma das técnicas mais versáteis de genotipagem do complexo *M. tuberculosis*. Baseia-se na metodologia PCR e analisa uma região cromossómica específica do complexo, o *locus* DR (*Direct Repeats*), pela determinação da ausência ou presença de espaçadores específicos entre as sequências DR. O *Spoligotyping* não só facilita a diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis*, como também é útil na determinação da origem geográfica das estirpes. A existência de um banco de dados internacional permite uma comparação a este nível<sup>4,5</sup>.

## OBJECTIVOS

Tendo em consideração a informação citada procedemos ao *Spoligotyping* com a finalidade de estudar a distribuição de espécies e famílias de estirpes do complexo *M. tuberculosis* isoladas de doentes com tuberculose, do Hospital Fernando Fonseca. Este hospital da Grande Lisboa recebe doentes provenientes de áreas geográficas de uma grande densidade populacional e onde se localizam importantes núcleos de comunidades imigrantes.

De facto, Portugal tem acolhido recentemente um número considerável de pessoas oriundas de países onde a tuberculose é altamente prevalente. É desconhecida, porém, a situação portuguesa no que diz respeito à importação desta doença.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Estirpes

Foi analisada uma amostragem de 219 isolados de *M. tuberculosis* de doentes de tuberculose com cultura positiva internados no Hospital Fernando Fonseca entre 1999 e 2002 (1 isolado/doente).

As culturas de *M. tuberculosis* foram mantidas em meio Lowenstein Jensen (BBL™, Becton Dickinson, Quilaban, Portugal).

### *Spoligotyping*

A técnica do *Spoligotyping* foi efectuada segundo as recomendações do fabricante do *kit* membrana (Isogen Bioscience B.V., Maarsen, Netherlands). Em linhas gerais, procedeu-se à extracção do DNA bacteriano por fervura, seguido da amplificação e marcação por PCR da totalidade da região DR, com utilização de “*primers*” específicos. A detecção dos 43 oligonucleótidos, correspondendo aos espaçadores entre as sequências DR, realizou-se através de hibridação “*Southern Blot*”, utilizando a membrana disponibilizada com o *kit*, na qual os oligonucleótidos dos 43 espaçadores se encontram covalentemente ligados numa determinada ordem, paralelamente uns aos outros. Os produtos de PCR, marcados com biotina, foram aplicados com a ajuda de um *miniblotter* (Isogen Bioscience B.V., Maarsen, Netherlands), cujas ranhuras são dispostas perpendicularmente em relação ao padrão de linhas dos oligonucleótidos dos espaçadores. A hibridação foi efectuada e seguida por uma etapa de incubação em estrep-

tavidina-peroxidase, que liga a peroxidase aos produtos PCR. Estes produtos são reconhecidos por quimioluminescência, baseada na acção da peroxidase sobre o revelador ECL (“*enhanced chemiluminescence*”) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). A detecção dos sinais da hibridação foi obtida por exposição a uma película de auto-radiografia Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), permitindo a definição dos *Spoligotypes* pela presença ou ausência de um ou mais espaçadores.

### **Análise dos *Spoligotypes***

Os dados foram analisados pelo programa Excel que permitiu a ordenação e agrupamento dos diversos *Spoligotypes*. Os *Spoligotypes* partilhados por mais de uma estirpe foram designados ST (“*shared types*”)<sup>6</sup>.

A análise dos *Spoligotypes* foi efectuada utilizando a base de dados internacional<sup>6</sup> em cuja versão estão representados 817 isolados de *M. tuberculosis*, segundo o ST. Actualmente, 90% dos *Spoligotypes* descritos são partilhados (ST) e 20 ST representam 50 % da totalidade dos isolados.

Uma tentativa de agrupamento por famílias dos *Spoligotypes* identificados foi realizada segundo as regras descritas por Filliol e colaboradores<sup>4</sup>.

## **RESULTADOS**

A Fig. 1 corresponde a um exemplo dos resultados de uma membrana de análise por *Spoligotyping*. A simples observação revela importantes diferenças entre os isolados. Os dados de todas elas foram depois analisados por computador, originando STs como se resumem no Quadro I.

A partir dos 219 isolados analisados obtiveram-se 28 STs. Estes estão representados no Quadro I por ordem de frequência decrescente, acomodando 170 isolados, o que corresponde a 77,6 % do total.

Os restantes 49 isolados tem *Spoligotypes* únicos, não partilhados, e representam 22,4 % do total. Cinquenta por cento da totalidade dos isolados distribuem-se por 8 STs (Quadros I e III).

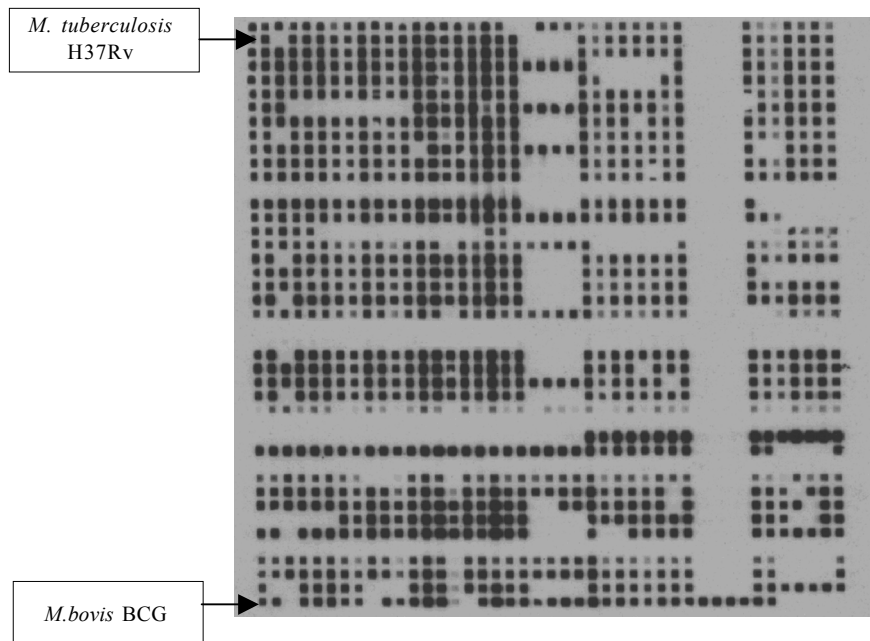
Obtiveram-se oito isolados aparentando o *M. bovis*, pela ausência característica dos espaçadores 39 a 43, representando 3,7 % do total. O ST de *M. bovis* (perfil n.º 120) contém 5 estirpes, enquanto os *Spoligotypes* não partilhados contribuíram com mais 3 estirpes, levando a oito o número total de estirpes com um *Spoligotype* aparentado a *M. bovis*. Nenhum destes *Spoligotypes* aparenta o do *M. bovis* BCG, fornecido como padrão pelo kit.

Entre os STs identificados reconhecemos padrões representativos de famílias ou regiões geográficas<sup>4</sup>: LAM (“*Latino-American Mediterranean*”, América Latina e Mediterrâneo), Haarlem, T (uma família de genótipos relativamente antigos), Beijing e CAS (Ásia Oriental), apresentadas nos Quadros I e III.

Uma percentagem importante dos STs não foram identificados (6/28 - 21,4 %), enquanto 33/49 - 67,3 % dos *Spoligotypes* não partilhados não foram classificados, levando a um número total de 39/77 *Spoligotypes* não identificados, o que corresponde a 50,6 %.

## **DISCUSSÃO**

O Hospital Fernando Fonseca, vulgarmente designado por Hospital Amadora-Sintra, recebe doentes provenientes das seguintes freguesias: Algueirão-Mem Martins, Amadora, Agualva-Cacém, Pêro Pinheiro, Queluz-Belas, Reboleira, Rio de Mouro-Rinchoa, Sintra e Venda Nova. Nalgumas destas freguesias localizam-se importantes núcleos de comunidades africanas, originárias sobretudo da Guiné-Bissau, de Cabo Verde, de Angola e de S. Tomé e Príncipe. Os núcleos mais importantes, e por ordem de antiguidade, localizam-se nas freguesias de Amadora, Agualva-Cacém, Rio de Mouro, Queluz-Belas, Reboleira e Algueirão-Mem Martins. Também existem grupos de etnia cigana, além



**Fig. 1.** Exemplo dos resultados de uma membrana de análise por *Spoligotyping*, incluindo os controlos *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG e negativos.

de conjuntos de imigrantes de Leste, cujo o número total actualmente em Portugal já atingiu os 70 000 indivíduos.

Presentemente, no nosso país, desconhece-se a situação relativa à importação da tuberculose. Este conhecimento é de facto cada vez mais relevante dada a integração de um número importante de pessoas provenientes de países onde a infecção é prevalente. O objectivo deste estudo foi contribuir para a determinação da origem geográfica ou família de estirpes de *M. tuberculosis* isoladas de doentes, pela análise dos *Spoligotypes* em base de dados.

O complexo *M. tuberculosis* contém várias espécies causadoras de tuberculose humana. *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii* são agentes da tuberculose humana, enquanto nos principais hospedeiros do *M. bovis* e do *M. microti* são os bovinos e os roedores, respectivamente<sup>1</sup>.

De facto, o *M. tuberculosis* é o maior responsável pela tuberculose em humanos, infecta mais

de 1/3 da população mundial e a sua mortalidade no adulto atinge 1,87 milhões de indivíduos<sup>7</sup>, sendo este o agente infeccioso, mais do que qualquer outro, responsável por mais casos de morte em adultos.

O *M. africanum* desencadeia doença com as mesmas características da causada pelo *M. tuberculosis*, mas, contrariamente a este, corresponde a uma espécie para a qual a distribuição geográfica parece ser limitada<sup>1, 8-11</sup>. Apesar da mobilidade histórica das populações africanas, o *M. africanum* é isolado predominantemente em África. Esta micobactéria foi descrita pela primeira vez em 1968 num paciente senegalês. Desde então, estudos representando milhares de estirpes mostraram que o *M. africanum* é geralmente responsável pela tuberculose em pacientes originários da África subsariana. No entanto, também já foi identificado em pacientes europeus sem ligação aparente com a África. Em certas regiões africanas (Iundé,



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PELO MÉTODO DE *SPOLIGOTYPING* DE ESTIRPES DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLADAS NO HOSPITAL FERNANDO FONSECA/ SUZANA DAVID, CLARA PORTUGAL, ABÍLIO ANTUNES, ÂNGELA CARDOSO, ANA CALADO, VANESSA BARROS, LUÍSA SANCHO

**QUADRO II**

Distribuição global dos *Spoligotypes* mais frequentes  
(Adaptado de Filliol et al. 2002)

Região	Família de <i>M. tuberculosis</i>	ST <sup>(1)</sup>	Frequência (%)
América do Norte	Beijing	ST 1	16
	X	ST 137 ST 119	14
	Não Classificada	-	8
América Central	T1	ST 53	8
	Haarlem3	ST 50	7
	Haarlem2	ST 2	6
América do Sul	T1	ST 53	10
	Haarlem3	ST 50	9
	LAM9	ST 42	9
África	Não Classificada	ST 59	9
	T1	ST 53	
	Afri1	ST 181	6
Europa	T1	ST 53	9
	Haarlem3	ST 50	8
	Haarlem1	ST 47	
	Beijing	ST 1	4
Ásia Central e Médio Oriente	EAI	vários	-
	CAS		
Região Leste da Ásia	Beijing	ST 1	50
Oceânia	EAI2	ST 19	15
	Beijing	ST 1	13

<sup>(1)</sup> Shared Types (tipos de *Spoligotype* partilhados)

**QUADRO III**

*Spoligotypes* representando aproximadamente 50% dos tipos mais frequentes dos isolados do Hospital Fernando Fonseca

Família de <i>M. tuberculosis</i>	ST	Frequência (%)
LAM1	ST 20	12,8
LAM9	ST 42	12,3
T1	ST 53	6,4
Haarlem3	ST 50	4,6
LAM6	ST 64	4,1
Haarlem1	ST 47	4,1
Não Classificada	ST 244	3,2
Não Classificada	ST 150	2,7

A técnica estandardizada de hibridação por Southern Blot permite a criação dos “*fingerprints*” de DNA, os quais podem ser comparados entre laboratórios, com a ajuda de programas de análise de imagem. É uma técnica de análise do DNA que requer não só a cultura bacteriana de *M. tuberculosis*, cujo crescimento é lento e escasso, mas também o *software* de análise de imagem, nem sempre acessível. Além disso, esta técnica não permite a diferenciação entre as espécies do complexo *M. tuberculosis*. Entre nós, alguns estudos relevam a

importância do RFLP em investigações epidemiológicas<sup>15-17</sup>.

Mais versáteis têm sido uma série de técnicas recentemente desenvolvidas com base na análise PCR, incluindo a técnica do *Spoligotyping*. O *Spoligotyping* permite reconhecer a presença ou ausência de espaçadores do locus DR<sup>18</sup>. O locus DR é uma região cromossômica que contém, em número variável, a sequência curta DR, de 36 pares de base. Esta sequência está separada por espaçadores não repetitivos, também de sequência curta, de 35 a 41 pares de base. A técnica analisa a presença ou ausência de 43 espaçadores do locus DR, cuja sequência é conhecida. O PCR efectuado utiliza *primers* baseados na sequência do DR e o DNA dos espaçadores é amplificado. Depois é detectado por hibridação com oligonucleótidos representando as sequências específicas dos espaçadores, o que explica a designação *Spoligotyping* - “*Spacer oligonucleotide typing*”.

Esta técnica tem diversas vantagens: a execução é rápida, tem uma muito boa reprodutibilidade, não requer um investimento excessivo em equipamento específico, não necessita de um *software* para a interpretação, permite a análise de um grande número de estirpes e um bom nível de diferenciação para a análise epidemiológica e, contrariamente, ao *fingerprinting* por IS6110, facilita a diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis* pela simples análise visual da membrana.

A base de dados internacional, na versão utilizada, contém representados 817 isolados de *M. tuberculosis*, segundo o ST (“*shared type*”)<sup>6</sup>. Uma tentativa de agrupamento por famílias ou regiões geográficas está em curso<sup>4</sup>, Quadro II: a família ancestral da África Oriental e Índia (EAI, *East-African India family*); a família Haarlem; a família de Ásia Oriental (CAS); a família X; a família T (uma família de genótipos mais antigos); a família “*Latino-American Mediterranean*” (LAM, América Latina e Mediterrâneo); e a família Beijing. Tenta-se igualmente a análise da distribuição mundial dos *Spoligotypes* mais frequentemente identificados,

o que permite, por exemplo, constatar que 50% das estirpes isoladas na Ásia Oriental pertencem à família Beijing (ST 1). Na Europa esta percentagem é em média de 4%, enquanto a família mais frequente é a T1 (ST 53), com 9 % de frequência, seguida da família Haarlem (ST 47 e ST 50), com 8%.

Com o auxílio da base de dados, mostrámos que os *Spoligotypes* predominantes no nosso estudo pertenciam à família LAM, com 29,2 % do total. A família maioritária LAM 1 (ST 20) - 12,8 %, não consta como maioritária nas regiões analisadas<sup>4</sup>. A segunda família mais numerosa LAM 9 (ST 42) - 12,3 %, está frequentemente associada a estirpes provenientes da América do Sul. O que nos deixa alerta para a possível importação da doença a partir de populações oriundas de países desta parte do mundo. No nosso estudo foram identificadas, em proporções próximas das da Europa, as famílias T1 e Haarlem, 6,4 % e 8,7 %, respectivamente. O facto de a família Beijing (ST 1) só representar nesta amostragem 1,4 % poderá corresponder a um factor relacionado com um problema emergente no nosso país, decorrente da recente imigração de populações asiáticas e da Europa Oriental. As razões da distribuição geográfica desta família ainda são desconhecidas e podem estar relacionadas com factores de transmissibilidade e factores de virulência, como a sua frequente associação à vacinação BCG ou outros.

Os casos de tuberculose por estirpes com um *Spoligotype* do tipo *M. bovis* foram em número elevado, 3,4 %. Como a infecção por *M. bovis* é de facto extremamente rara, existe a possibilidade de estas infecções não serem por *M. bovis* mas por *M. bovis* BCG, até porque existe um contacto frequente na população com a segunda, face à vacinação BCG e eventuais terapias anticancerosas com base em BCG recombinante. Por outro lado, devido à existência de um contínuo estado evolutivo entre o *M. bovis* e o *M. tuberculosis*, passando pelo *M. africanum*, pensamos que será possível que algumas destas estirpes possam ser classificadas como *M. africanum* e não como *M. bovis*. Estes

assuntos necessitaram de estudos micobacteriológicos mais completos. Em relação a outras estirpes, destaca-se a obtenção de uma estirpe clínica com o mesmo *Spoligotype* do controlo *M. tuberculosis* H37Rv (ST 451). Mais curiosa foi a recolha de 6/28, representando 21,4 % de ST não identificados na base de dados.

Actualmente, a base de dados é considerada uma ferramenta experimental para a qual a utilidade na pesquisa epidemiológica ainda necessita de ser avaliada. No entanto, a facilidade com que permite a comparação de *Spoligotypes* sugere desde já que poderá vir a ser útil em estudos da dinâmica de transmissão dentro das populações e a proveniência geográfica de estirpes isoladas em Portugal. De facto, a junção de técnicas de genotipagem molecular modernas e de métodos epidemiológicos convencionais tem dado origem e relevância a uma nova estratégia colaborativa no estudo da dinâmica de distribuição das doenças, conhecida por epidemiologia molecular.

Este estudo é o primeiro levado a cabo entre nós e poderá ser o ponto de partida para a criação de uma base de dados com importantes consequências sobre o programa nacional de luta contra a tuberculose.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Hugo L. David, Professor Honorário do Instituto Pasteur de Paris, e consultor da UEI de Micobacteriologia (IHMT), o seu apoio e sugestões no decorrer desta investigação. Agradecemos também ao Prof. Leonard Amaral, director da UEI de Micobacteriologia (IHMT), o seu interesse por este trabalho. Igualmente testemunhamos o nosso agradecimento a Christophe Sola e Nalin Rastogi (Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur de Guadalupe, Guadalupe), por nos terem facultado a sua base de dados de *Spoligotype*. Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação Calouste Gulbenkian e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

#### BIBLIOGRAFIA

1. VAN SOOLINGEN D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249(1):1-26. Review
2. BIFANI P.J., MATHEMA B., LIU Z., MOGHAZEH S.L., SHOPSIN B., TEMPALSKI B., DRISCOLL J., FROTHINGHAM R., MUSSER J.M., ALCABES P., KREISWIRTH B.N. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999; 282: 2321-2327.
3. GLYNN J.R., WHITELEY J., BIFANI P.J., KREMER K., VAN SOOLINGEN D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(8):843-9.
4. FILLIOL I., DRISCOLL J.R., VAN SOOLINGEN D., KREISWIRTH B.N., KREMER K., VALETUDIE G., ANH D.D., BARLOW R., BANERJEE D., BIFANI P.J., BRUDEY K., CATALDI A., COOKSEY R.C., COUSINS D.V., DALE J.W., DELLAGOSTIN O.A., DROBNIEWSKI F., ENGELMANN G., FERDINAND S., GASCOYNE-BINZI D., GORDON M., GUTIERREZ M.C., HAAS W.H., HEERSMA H., KALLENIUS G., KASSA-KELEMBHO E., KOIVULA T., LY H.M., MAKKRISTATHIS A., MAMMINA C., MARTIN G., MOSTROM P., MOKROUSOV I., NARBONNE V., NARVSKAYA O., NASTASI A., NIOBE-EYANGO S.N., PAPE J.W., RASOLOFO-RAZANAMPARANY V., RIDELL M., ROSSETTI M.L., STAUFFER F., SUFFYS P.N., TAKIFF H., TEXIER-MAUGEIN J., VINCENT V., DE WAARD J.H., SOLA C., RASTOGI N. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(11):1347-9.
5. SOLA C., FILLIOL I., GUTIERREZ M.C., MOKROUSOV I., VINCENT V., RASTOGI N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(3):390-6.
6. [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)
7. World Health Organization, Health Report, 1999.
8. DAVID H.L., JAHAN T.M., JUMIN A., GRANDRY J., LEHMAN E.H. Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *Int J Systematic Bacteriol* 1978; 467-472
9. 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(1):152-7.
10. VIANA-NIERO C., GUTIERREZ C., SOLA C., FILLIOL I., BOULAHBAL F., VINCENT V., RASTOGI N. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of

- tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1):57-65.
11. KÄLLENIUS G., KOIVULA T., GHEBREMICHAEL S., HOFFNER S.E., NORBERG R., SVENSSON E., DIAS F., MARKLUND B.-I., SVENSON S.B. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guine-Bissau, *J Clin Microbiol* 1999; 37:3872-8.
  12. RIVERO A., MARQUEZ M., SANTOS J., PINEDO A., SANCHEZ M.A., ESTEVE A., SAMPER S., MARTIN C. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clin Infect Dis*. 2001; 32(1):159-61. Epub 2000 Dec 11.
  13. KAZWALA R.R., DABORN C.J., SHARP J.M., KAMBARAGE D.M., JIWA S.F., MBEMBATI N.A. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern? *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(1):87-91.
  14. VAN EMBDEN J.D.A., CAVE M.D., CRAWFORD J.T., DALE J.W., EISENACH K.D., GICQUEL B., HERMANS P., MARTÍN C., MCADAM R., SHINNICK T.M., SMALL P.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31:406-9.
  15. COVAS M.J., BRUM L., PORTUGAL I., BERNARDO J.L., VIVEIROS M., DAVID H., FERRINHO P. Estudo epidemiológico de um surto de tuberculose multirresistente na área metropolitana de Lisboa. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 1998; (1-2):38-44.
  16. HANNAN M.M., PERES H., MALTEZ F., HAYWARD A.C., MACHADO J., MORGADO A., PROENCA R., NELSON M.R., BICO J., YOUNG D.B., GAZZARD B.S.; Investigation and control of a large outbreak of multi-drug resistant tuberculosis at a central Lisbon hospital. *J Hospital Infect* 2001; vol. 47, Issue 2:91-97.
  17. PORTUGAL I., COVAS M.J., BRUM L., VIVEIROS M., FERRINHO P., MONIZ-PEREIRA J., DAVID H. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(3):207-13.
  18. GROENEN P.M.A., BUNSCHOTEN A.E., VAN SOOLINGEN D., VAN EMBDEN J.D.A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; Application for strain differentiation by a novel method. *Mol Microbiol* 1993; 10 (5):1057-1065.