

Suzana David<sup>\*</sup>  
Vanessa Barros<sup>\*</sup>  
Clara Portugal<sup>\*\*</sup>  
Abílio Antunes<sup>\*\*\*</sup>  
Ângela Cardoso<sup>\*</sup>  
Ana Calado<sup>\*</sup>  
Luísa Sancho<sup>\*\*</sup>  
José Germano de Sousa<sup>\*\*</sup>

## Novos dados sobre os *Spoligotypes* de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Hospital Fernando Fonseca (Amadora-Sintra, Portugal)

### *Update on the Spoligotypes of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from the Fernando Fonseca Hospital (Amadora-Sintra, Portugal)*

Recebido para publicação/received for publication: 05.09.05  
Aceite para publicação/accepted for publication: 05.10.20

#### Resumo

O presente estudo populacional, que decorreu entre 1999 e 2003, foi baseado na utilização do *Spoligotyping* na genotipagem de 452 isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* de doentes com tuberculose internados no Hospital Fernando Fonseca. *Spoligotypes* foram identificados como *shared types* (ST) recorrendo a uma base de dados internacional. Onze ST raros, não identificados na base de dados, acomodaram 8,4% dos isolados. Aliás, particular a Portugal poderá ser a predominância de ST identificados na base de dados mas não previamente classificados como famílias genotípicas, tais como o ST244, ST150 e ST389, representando 13,3 % do

#### Abstract

The present population study, from 1999 to 2003, has been based on the use of *Spoligotyping* in the genotyping of 452 isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients of the Fernando Fonseca Hospital. *Spoligotypes* were identified as “shared types” (STs) with the aid of an international database. Eleven rarely found STs, not identified in the database, grouped 8.4% of the isolates. Moreover, particular to Portugal, may be the predominance of STs identified in the database but not previously classified as genotypic families, such as ST244, ST150 and ST389, representing 13.3 % of the total. The identification of clinical

<sup>\*</sup> Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Micobacteriologia, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)/Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisboa./ *Microbacteriology Teaching and Research Unit (TRU), Hygiene and Tropical Medicine Institute (HTMI)/ Nova University Lisbon (NUL), Lisbon.*

<sup>\*\*</sup> Serviço de Patologia Clínica, Hospital Fernando Fonseca, Amadora./ *Clinical Pathology Department, Fernando Fonseca Hospital, Amadora.*

<sup>\*\*\*</sup> UEI de Clínica e Doenças Tropicais/IHMT/UNL, Lisboa./ *TRU of the Tropical Diseases Clinic, HTMI / NUL. Lisbon.*

total. A identificação de isolados clínicos de *M. africanum* de genótipo Afri1 e de *M. tuberculosis* de genótipo CAS1 poderá confirmar a importação de isolados de origem africana e asiática. *M. tuberculosis* da família Beijing foi pela primeira vez por nós assinalado a partir de 1999. Desde então, o número de isolados provenientes do hospital passou de um para cinco, anualmente, representando actualmente 2,2%, o que a coloca em décimo lugar em prevalência. *M. tuberculosis* Beijing poderá corresponder a um problema emergente em Portugal devido à recente imigração proveniente da Europa Oriental e da Ásia. Outros genótipos, ST150 e ST389, mostraram um incremento, cujo significado não é claro. No entanto, as frequências relativas das famílias predominantes LAM, T1 e Haarlem mantiveram-se relativamente estáveis. O presente estudo confirma a variabilidade genética em Portugal dos isolados do complexo *M. tuberculosis*. Estes estudos poderão contribuir para a definição de prioridades nos programas nacionais de luta contra a tuberculose.

Rev Port Pneumol 2005; XI (6): 513-531

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

isolates of *M. africanum* genotype Afri1 and of *M. tuberculosis* genotype CAS1 may confirm import of isolates of African and Asian origin. *M. tuberculosis* of the Beijing family was first reported by us as of 1999. Since then, the number of isolates at the Hospital has passed from one to five annually, representing 2.2% of the total and the tenth most predominant family in the present study. *M. tuberculosis* Beijing may correspond to an emerging problem in Portugal due to recent immigration from Eastern Europe and Asia. Other genotypes, ST150 and ST389, have shown increase, the significance of which is not clear. However, the relative frequencies of the predominant families LAM, T1 and Haarlem remained relatively stable. The present study confirms the genetic variability in Portugal of *M. tuberculosis* complex isolates. These studies may contribute to the definition of priorities in the national tuberculosis control programs.

Rev Port Pneumol 2005; XI (6): 513-531

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

### Introdução

A contribuição da tipagem molecular de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* – genotipagem – é, sem dúvida, uma ferramenta imprescindível na compreensão da situação portuguesa relativamente à tuberculose.

Num estudo recente foi analisada uma amostragem de 219 isolados do complexo

### Introduction

The contribution to molecular typing – genotyping – of the *Mycobacterium tuberculosis* strain is without a doubt an indispensable tool in understanding the tuberculosis situation in Portugal.

In a recent study, a sample of 219 isolates of the complex *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) was analysed from tuberculosis

*Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) de doentes com tuberculose internados no Hospital Fernando Fonseca, entre os anos 1999 e 2002<sup>1</sup>. A análise genotípica destes isolados foi baseada na técnica do *Spoligotyping* que analisa uma região cromossómica específica do MTBC, o locus DR (*Direct Repeats*)<sup>2-4</sup>. A existência de uma base de dados internacional de *Spoligotype*<sup>5</sup> e a facilidade com que esta permite comparar e nomear *Spoligotypes* tem sido útil em estudos da dinâmica de transmissão dentro das populações e da proveniência geográfica de estirpes isoladas.

De facto, com o *Spoligotyping*, existe pela primeira vez na história da tuberculose a possibilidade de obter com facilidade informações relativas à distribuição geográfica de espécies e famílias genotípicas do MTBC. O próprio MTBC, que inclui as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis* (entre os quais se encontra a estirpe vacinal *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti* e o *M. canetti*, tem-se revelado muito mais vasto do que originalmente se pensava, criando a actual polémica sobre a nomenclatura que se encontra em plena e rápida evolução.

Com o auxílio de uma base de dados internacional, o nosso primeiro estudo de carácter populacional revelou a predominância de famílias genotípicas comuns aos países da Europa Ocidental (LAM, Latino-American Mediterranean, T, Haarlem), mas também nos alertou quanto à possível importação da tuberculose de populações oriundas da América do Sul, da Ásia e da Europa Oriental<sup>1</sup>.

### Objectivos

Tendo em consideração a informação citada, o objectivo do presente trabalho é

patients hospitalized at the Fernando Fonseca Hospital between 1999 and 2002<sup>1</sup>. The genotype analysis of these isolates was made based on the *Spoligotyping* technique which analyses a specific chromosome region of MTBC, the DR (*Direct Repeats*)<sup>2-4</sup> locus. The existence of the international *Spoligotype*<sup>5</sup> database and the ease with which this allows us to compare and identify *Spoligotypes* has been useful in studies into the dynamics of transmissions between populations and the geographical provenance of isolates.

In fact, the existence of *Spoligotyping* means that information on the geographical distribution of MTBC genotypic species and families can be easily gleaned for the first time in the history of tuberculosis. MTBC, which includes the species *M. tuberculosis*, *M. bovis* (among which is the vaccine strain *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti* and *M. canetti*, has turned out to be substantially greater than was originally thought. This has led to the current heated and rapidly changing discussion over the nomenclature.

With the help of an international data base our first study into the populational character revealed the predominance of genotypic families common to Eastern European (LAM “Latino-American Mediterranean”, T, Haarlem), but also called attention to the possible importance of tuberculosis in the populations coming from South America, Asia and Eastern Europe<sup>1</sup>.

### Aims

Taking the abovementioned information into account, the aim of this study is to update the first study by using *Spoligotyping* to analyse the 452 MTBC isolates taken

---

Com o *Spoligotyping*, existe pela primeira vez na história da tuberculose a possibilidade de obter com facilidade informações relativas à distribuição geográfica de espécies e famílias genotípicas do MTBC

---

Com o auxílio de uma base de dados internacional, o nosso primeiro estudo de carácter populacional revelou a predominância de famílias genotípicas comuns aos países da Europa Ocidental (..) mas também nos alertou quanto à possível importação da tuberculose de populações oriundas da América do Sul, da Ásia e da Europa Oriental

actualizar o primeiro estudo pela análise por *Spoligotyping* de 452 estirpes do MTBC isoladas desde há cinco anos, entre 1999 e 2003, de doentes com tuberculose internados no Hospital Fernando Fonseca.

## **Materiais e métodos**

### **Estirpes**

Foram analisados 452 isolados do MTBC de doentes de tuberculose com cultura positiva internados no Hospital Fernando Fonseca colectados durante cinco anos entre 1999 e 2003 (1 isolado/doente).

As culturas 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 BV, Maarsen, Netherlands), como previamente descrita<sup>1</sup>. 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

over five years (1999 – 2003) from tuberculosis patients hospitalised at Fernando Fonseca Hospital.

## **Materials and methods**

### **Strains**

452 MTBC isolates which had been collected over a five year period (1999-2003) from tuberculosis patients with positive culture hospitalised at Fernando Fonseca Hospital were analysed. (1 isolate/patient).

The cultures were stored at a medium Lowenstein Jensen (BBL™, Becton Dickinson, Quilaban, Portugal).

### *Spoligotyping*

*Spoligotyping* was carried out in accordance with the recommendations of the membrane Kit manufacturer (Isogen Bioscience B.V., Maarsen, Netherlands), as previously described<sup>1</sup>. In general terms, bacterial DNA is extracted by boiling then the whole DR region is amplified and marked by PCR, using specific primers. 43 oligonucleotides, corresponding to the spacers between the DR sequences, were detected via “Southern Blot” hybridization using the membrane which comes with the Kit, and using this the oligonucleotides of the 43 spacers were discovered to be covalently linked in a determined order, parallel one to another. The PCR products, markers with biotin, were applied with the help of a miniblotter (Isogen Bioscience B.V., Maarsen, Netherlands) whose fissures are arranged perpendicularly in relation to the pattern of lines of the oligonucleotides of the spacers. The hybridization was carried out

BV, 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 estreptavidina-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 autorradiografia 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, como previamente descrito, pelo programa *Excel* que permitiu a ordenação e agrupamento dos diversos Spoligotypes<sup>1</sup>.

Os Spoligotypes partilhados por mais de uma estirpe foram designados ST (*shared types*). A análise dos Spoligotypes foi efectuada utilizando a base de dados internacional em cuja versão estão representados 817 isolados de *M. tuberculosis*, segundo o ST<sup>5</sup>. Uma tentativa de agrupamento dos Spoligotypes por famílias genotípicas foi realizada segundo as regras descritas por Filliol e colaboradores<sup>6,7</sup>.

#### **Estudo da susceptibilidade aos antibióticos de primeira linha**

Os sistemas Bactec™ 460TB ou Bactec™MGIT™960 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) foram utilizados no

and followed by an incubation stage in Streptavidin Peroxidase, which binds the peroxidase to the PCR products. These products are detected by chemiluminescence based on the action of the peroxidase on the developer ECL (“enhanced chemiluminescence”) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). The detection of signs of hybridization was made by exposing a film of autoradiography – Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) – which defines the Spoligotypes by the presence or absence of one or more spacers.

#### **Analysis of the Spoligotypes**

An Excel program was used to analyse the data, as mentioned above. The program was designed to order and group the various Spoligotypes<sup>1</sup>.

Spoligotypes common to more than one strain were called STs (*shared types*). The Spoligotypes were analysed using a version of an international data base housing 817 ST<sup>5</sup> *M. tuberculosis* isolates.

The criteria drawn up by Filliol et al were those used to group the Spoligotypes by genotypic families<sup>6,7</sup>.

#### **Research into the susceptibility of first line antibiotics**

Both the Bactec™ 460TB and the Bactec™MGIT™960 systems (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) were used in the study into the susceptibility of first line antibiotics, in accordance with the criteria of the Fernando Fonseca Hospital laboratory norms which were in use between 1999 and 2003. The study’s methodologies are based on a critical pro-

estudo da susceptibilidade aos antibióticos de primeira linha segundo os critérios do plano laboratorial do Hospital Fernando Fonseca, em vigor entre os anos de 1999 e 2003. As metodologias estão baseadas no estudo da proporção crítica de 1%, avaliada comparando o crescimento em presença de antibiótico com o crescimento do controlo sem antibiótico, mas recebendo um inóculo inicial 100 vezes mais diluído, designado por controlo 1:100. A execução das provas de resistência são efectuadas segundo as instruções do fabricante que fornece os liofilizados dos antibióticos estreptomicina, isoniazida, etambutol, rifampicina e PZA para utilização em meios Bactec™ 12B (no instrumento Bactec™ 460TB) ou Bactec™MGIT™ (no instrumento Bactec™MGIT™ 960) ou, no caso específico da PZA, meio Bactec™ PZA (Bactec™ 460TB) ou Bactec™MGIT™ 960 PZA (Bactec™MGIT™ 960).

A multirresistência (MDR) significa que o bacilo é resistente a mais de um agente antituberculoso, incluindo a isoniazida e a rifampicina<sup>8</sup>.

### Resultados

Dos 452 *Spoligotypes* dos isolados analisados, trezentos e setenta e quatro, 82,7%, foram acomodados dentro de 47 ST. Destes, 36 ST correspondentes a 336 dos isolados, 74,3%, estão representados no Quadro I por ordem de frequência decrescente, estando identificados na base de dados internacional pelo um número ST<sup>5</sup>. Onze destes ST, representando 38 isolados, 8,4%, representados no Quadro II, não foram identificados na base de dados internacional (sem número ST).

portion of 1%, evaluated by comparing growth when antibiotics are present with growth in the Control in which no antibiotics are present, but receiving an initial inoculation 10 times more diluted, called control1:100. The resistance trials were carried out in accordance with the instructions of the manufacturer who supplied the lyophilisates of the Streptomycin, Isoniazid, Ethambutol, Rifampicin and Pyrazinamide (PZA) antibiotics to be used in the Bactec™ 12B method (in the Bactec™ 460TB tool) or Bactec™MGIT™ (in the Bactec™MGIT™ 960 tool) or, in the specific case of PZA, Bactec™ PZA method (Bactec™ 460TB) or Bactec™MGIT™ 960 PZA (Bactec™MGIT™ 960).

Multi-drug resistant (MDR) means that the bacillus is resistant to more than one antituberculosis agent, including Isoniazid and Rifampicin<sup>8</sup>.

### Results

Of the 452 *Spoligotypes* of the isolates analysed, three hundred and seventy four (82.7%) fitted into 47 STs. Of these, 36 STs, corresponding to 336 of the isolates (74.3%), are shown in Table I in descending order of frequency. They were identified on the international data base by an ST<sup>5</sup> number. Eleven of these STs, representing 38 isolates (8.4%), and shown on Table II, were not identified on the international data base (no ST number).

Unique Spoligotypes, not shared, were found in 78 isolates, representing 17.3% of the total number of isolates analysed (data not shown).

Approximately 50% of the total number of was distributed into 9 STs. Among



Table I – *Spoligotypes* identified in the international data base<sup>1</sup>

ST <sup>1</sup>	Family <sup>2</sup>	Freq. <sup>4</sup>	N.º of isolates <sup>5</sup>	
20	LAM1	11.1%	50	
42	LAM9	10.8%	49	
53	T1	6.6%	30	
244	NC <sup>3</sup>	6.0%	27	
150	NC	4.2%	19	
47	Haarlem	4.0%	18	
50	Haarlem	3.1%	14	
389	NC	3.1%	14	
64	LAM6	2.9%	13	
34	S	2.4%	11	
1	Beijing	2.2%	10	
118	NC	1.5%	7	
17	LAM2	1.3%	6	
51	NC	1.1%	5	
92	X3	1.1%	5	
157	NC	0.9%	4	
49	NC	0.9%	4	
44	NC	0,9%	4	
4	NC	0.9%	4	
73	NC	0.9%	4	
33	LAM3	0.9%	4	
58	NC	0.9%	4	
211	NC	0.7%	3	
344	NC	0.7%	3	
26	CAS1	0.4%	2	
193	NC	0.4%	2	
793	NC	0.4%	2	
154	NC	0.4%	2	
29	NC	0.4%	2	
181	Afri1	0.4%	2	
81	NC	0.4%	2	
93	LAM5	0.4%	2	
173	NC	0.4%	2	
151	NC	0.4%	2	
402	NC	0.4%	2	
60	LAM4	0.4%	2	

<sup>1</sup> Table representing 74.3% of the total amount of isolates analysed identified in the international *Spoligotype* data base: [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)

<sup>2</sup> Name of genotypic family (Filiol et al., 2002).

<sup>3</sup> NC = Non Classified: non classified genotypic family (Filiol et al., 2002).

<sup>4</sup> Freq. = Frequency relative to the total number of isolates, expressed in a percentage (%).

<sup>5</sup> N.º of isolates = Number of isolates between 1999 and 2003.



*Spoligotypes* únicos, não partilhados, foram deparados em 78 isolados, representando 17,3% da totalidade dos isolados analisados (dados não apresentados).

Aproximadamente 50% da totalidade dos isolados encontram-se distribuídos por 9 ST. Entre estes ST, dos mais representados, reconhecemos seis padrões representativos de famílias genotípicas ou regiões geográficas<sup>6,7</sup>: LAM (*Latino-American Mediterranean*, América Latina e Mediterrâneo), Haarlem e T (uma família de genótipos relativamente antigos) (Quadros I e III). Os restantes três não foram identificados como famílias genotípicas nos trabalhos internacionais: ST244, ST150, e ST389.

these STs, of the most represented, we recognised six patterns representative of genotypic families or geographical regions<sup>6,7</sup>: LAM (*Latino-American Mediterranean*), Haarlem and T (a relatively old genotypic family). (Tables I and III). The remaining three, ST244, ST150, and ST389, were not identified as genotypic families in international studies.

While the annual proportions of some STs show only a small variation, as is the case with ST20 (LAM1), ST42 (LAM9), ST53 (T1) and ST244, in others an apparent growth or decrease can be seen, as illustrated in Figure 1. For example, between 2001 and 2003 an increase in the frequency of ST150, ST389 and ST1 (Beijing), and a

Quadro II – *Spoligotypes* não identificados na base de dados internacional<sup>1</sup>

Freq. <sup>2</sup>	N.º de Isolados <sup>3</sup>	<i>Spoligotypes</i>
1,8%	8	
1,3%	6	
0,9%	4	
0,7%	3	
0,7%	3	
0,7%	3	
0,7%	3	
0,4%	2	
0,4%	2	
0,4%	2	
0,4%	2	
NA <sup>5</sup>	Controlo BCG <sup>4</sup>	
NA <sup>5</sup>	Controlo H37Rv <sup>4</sup>	

<sup>1</sup> Tabela representando 8,4% da totalidade dos isolados analisados, não identificados na base de dados internacional de *Spoligotype*: [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)

<sup>2</sup> Freq. = Frequência relativa ao número total de isolados, expressa em percentagem (%).

<sup>3</sup> N.º de isolados = Número de isolados entre 1999 e 2003.

<sup>4</sup> Controlos do *Spoligotyping*: *M. tuberculosis* H 37Rv e *M. bovis* BCG.

<sup>5</sup> NA = Não aplicável.

Table II – *Spoligotypes* non identified in the international data base<sup>1</sup>

Freq. <sup>2</sup>	N.º of Isolates <sup>3</sup>	<i>Spoligotypes</i>
1.8%	8	
1.3%	6	
0.9%	4	
0.7%	3	
0.7%	3	
0.7%	3	
0.7%	3	
0.4%	2	
0.4%	2	
0.4%	2	
0.4%	2	
NA <sup>5</sup>	Control BCG <sup>4</sup>	
NA <sup>5</sup>	Control H37Rv <sup>4</sup>	

<sup>1</sup> Table representing 8.4% of the total number of isolates analysed not identified in the international *Spoligotype* database: [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)

<sup>2</sup> Freq. = Frequency relative to the total number of isolates, expressed in a percentage (%).

<sup>3</sup> N.º of isolates = Number of isolates between 1999 and 2003.

<sup>4</sup> Controls of *Spoligotyping*: *M. tuberculosis* H 37Rv and *M. bovis* BCG.

<sup>5</sup> NA = Non Applicable.

Enquanto as proporções anuais de alguns ST variam pouco, como é o caso do ST20 (LAM1), ST42 (LAM9), ST53 (T1) e ST244, com outros observou-se um aparente aumento ou diminuição, como ilustrado na Fig. 1. Por exemplo, entre 2001 e 2003 observou-se um aumento nas proporções de ST150, ST389 e ST1 (Beijing) e uma diminuição nos casos dos ST47 e ST50 (Haarlem1 e Haarlem3, respectivamente). A família mais importante em décimo lugar pelo número de isolados é a família Beijing. Esta família representa 2,2% do total dos isolados, revelando um aumento progressivo desde a sua primeira observação em 1999 no hospital<sup>1</sup> (Fig.1). Neste estudo, nenhum dos isolados da família Beijing era MDR.

decrease in the cases of ST47 and ST50 (Haarlem1 and Haarlem3, respectively) was seen.

The most important family in tenth place due to the number of isolates is the Beijing family. This family represents 2.2% of the total number of isolates, showing that it has been increasing progressively since it was first observed in the Hospital in 1999<sup>1</sup> (Fig.1). In this study, none of the isolates of the Beijing family was MDR.

Genotypic families of African and Asiatic origin were identified. Two clinical cases of *M. africanum* ST181 (AFRI 1) were identified in 2003, and in 2002 two cases of *M. tuberculosis* of the CAS1 family were identified (Table IV).

The MDR isolates represent 6.4% do to-

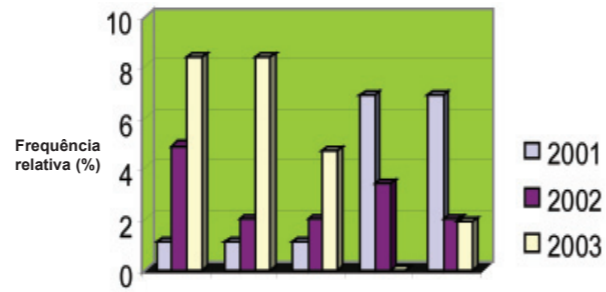


Fig. 1 – Família ou Spoligotypes de *Mycobacterium tuberculosis*.

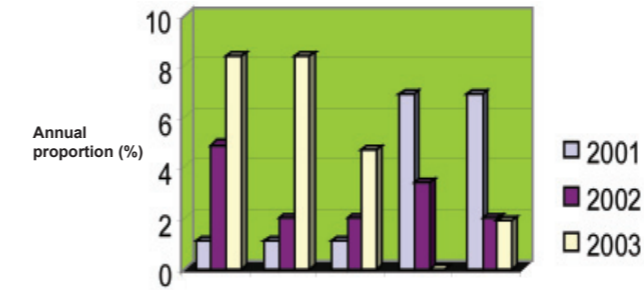


Fig. 1 – *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes or family.

Foram identificadas famílias genotípicas de origem africana e asiática. Em 2003, identificámos dois casos clínicos por *M. africanum* ST181 (AFRI 1) e em 2002 dois casos por *M. tuberculosis* da família CAS1 (Quadro IV).

tal. Three genotypic families, defined by their LAM1, LAM9 and ST389 Spoligotypes, make up 58.6% of the MDR isolates. The MDR strain was four times more prevalent in ST389 than in the other Spoligotypes (Table V).

Quadro III – Spoligotypes representando aproximadamente 50% dos ST mais frequentes dos isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* dos doentes com tuberculose do Hospital Fernando Fonseca.

Família <sup>1</sup>	ST <sup>3</sup>	Freq. (%) <sup>4</sup>
LAM1	ST 20	11.1
LAM9	ST 42	10.8
T1	ST 53	6,6
NC <sup>2</sup>	ST 244	6.0
NC <sup>2</sup>	ST 150	4.2
Haarlem1	ST 47	4.0
Haarlem3	ST 50	3.1
NC <sup>2</sup>	ST 389	3.1
LAM6	ST 64	2.9

<sup>1</sup> Nome da família genotípica (Filiol e coll., 2002).  
<sup>2</sup> NC = Não classificada: família genotípica não classificada (Filiol e coll., 2002).  
<sup>3</sup> Identificado na base de dados internacional de Spoligotype: [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)  
<sup>4</sup> Freq. = Frequência relativa ao número total de isolados, expressa em percentagem (%).

Table III – Spoligotypes representing approximately 50% of the most frequent STs of the isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex of tuberculosis patients at Fernando Fonseca Hospital.

Family <sup>1</sup>	ST <sup>3</sup>	Freq. (%) <sup>4</sup>
LAM1	ST 20	11.1
LAM9	ST 42	10.8
T1	ST 53	6,6
NC <sup>2</sup>	ST 244	6.0
NC <sup>2</sup>	ST 150	4.2
Haarlem1	ST 47	4.0
Haarlem3	ST 50	3.1
NC <sup>2</sup>	ST 389	3.1
LAM6	ST 64	2.9

<sup>1</sup> Name of genotypic family (Filiol et al., 2002).  
<sup>2</sup> NC = Not classified: genotypic family not classified (Filiol et al., 2002).  
<sup>3</sup> Identified in the international Spoligotype database: [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)  
<sup>4</sup> Freq. = Frequency relative to the total number of isolates, expressed in a percentage (%).



**Quadro V** – *Spoligotypes* representando aproximadamente 59% dos isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes (MDR)

Família <sup>1</sup>	ST <sup>3</sup>	Freq. em relação ao (%)		Razão <sup>6</sup>
		Nº de isolados <sup>4</sup>	Nº isolados MDR <sup>5</sup>	
LAM1	ST 20	34.5	11.0	3
LAM9	ST 42	10.3	10.8	1
NC <sup>2</sup>	ST 389	13.8	3.1	4

- <sup>1</sup> Nome da família genotípica (Filiol e coll., 2002).  
<sup>2</sup> NC = Não classificada: família genotípica não classificada (Filiol e coll., 2002).  
<sup>3</sup> Identificado na base de dados internacional de *Spoligotype*: [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)  
<sup>4</sup> Freq. = Frequência relativa em relação ao número total de isolados, expressa em percentagem (%).  
<sup>5</sup> Freq. = Frequência relativa em relação ao número de isolados MDR, expressa em percentagem (%).  
<sup>6</sup> Relação entre a frequência relativa em relação ao número de isolados e a frequência relativa em relação ao número de isolados MDR.

Os isolados MDR representaram 6,4% do total. Três famílias genotípicas, definidas pelos seus *Spoligotypes*, LAM1, LAM9 e ST389, acomodaram 58,6% dos isolados MDR. A MDR foi quatro vezes mais prevalente no ST389 do que nos outros *Spoligotypes* (Quadro V).

### Discussão

A tuberculose ameaça um terço da população mundial. Foi declarada emergência global desde 1993 (*Global Health Emergency*) devida a deterioração da situação do controlo em várias partes do mundo, o alastramento do VIH e o aumento da população.

Portugal continua a ser um dos países da UE com a maior taxa de incidência de tuberculose, com cerca de 34,4 casos/100 000 habitantes<sup>9</sup>. Vários factores fazem com que os parâmetros usuais de intervenção ou prevenção sejam também adaptados:

**TABLE V** – *Spoligotypes* representing approximately 59% of the isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* multi-drug resistant (MDR) complex

Family <sup>1</sup>	ST <sup>3</sup>	Freq. In relation to (%)		Reason <sup>6</sup>
		Nº of isolates	Nº of MDR isolates <sup>5</sup>	
LAM1	ST 20	34.5	11.0	3
LAM9	ST 42	10.3	10.8	1
NC <sup>2</sup>	ST 389	13.8	3.1	4

- <sup>1</sup> Name of genotypic family (Filiol et al., 2002).  
<sup>2</sup> = Not classified: genotypic family not classified (Filiol et al., 2002).  
<sup>3</sup> Identified in the international *Spoligotype* database: [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)  
<sup>4</sup> Freq. = Frequency relative to the total number of isolates, expressed in a percentage (%).  
<sup>5</sup> Freq. = Frequency relative to the total number of MDR isolates, expressed in a percentage (%).  
<sup>6</sup> Relationship between the frequency relative to the total number of isolates and the frequency relative to the total number of MDR isolates.

### Discussion

Tuberculosis poses a threat to a third of the world's population. It has been classified as a global health emergency since 1993 due to control of tuberculosis worsening in several parts of the world, the spread of HIV and the growth in the world's population.

Portugal remains one of the EU countries with a higher rate of tuberculosis, with around 34.4 cases/100 000 inhabitants<sup>9</sup>. There are several factors which have caused the normal intervention or prevention parameters to be adapted: An increase in HIV infection due to its frequent association with tuberculosis, the disease being brought to the country by immigrants coming from countries with insufficient means of controlling the disease and a 3.5% MDR proportion in Portugal in 2003<sup>9</sup>. This is above the European country average. MDR strains represent from

**A tuberculose foi declarada emergência global desde 1993**

**Portugal continua a ser um dos países da UE com a maior taxa de incidência de tuberculose**

**No contexto português, estudos baseados na genotipagem de estirpes do MTBC continuam a ser escassos**

o aumento da infecção por VIH devido à sua frequente associação à tuberculose, a situação relativa à importação da doença por via de populações imigrantes provenientes de países mostrando uma insuficiência nas medidas de controlo da tuberculose e uma proporção de 3,5% de MDR em Portugal em 2003<sup>9</sup> que ultrapassa a média dos países europeus. A MDR representa desde já, para as futuras gerações, uma ameaça que mereceria ser cuidadosamente avaliada<sup>8</sup> devido ao prolongamento da fase de transmissão, na possibilidade de estas estirpes virem a reinfectar indivíduos, mesmo estando estes sob cobertura antituberculosa contra uma estirpe sensível<sup>10,11</sup> e devido às características da fase de infecção latente que, na infecção por *M. tuberculosis*, pode ser particularmente longa.

Contudo, no contexto português, estudos baseados na genotipagem de estirpes do MTBC continuam a ser escassos. No entanto, estes são extremamente úteis em epidemiologia da tuberculose para identificação de factores da distribuição da doença, temporal e geograficamente, de factores de transmissão, bem como de manifestação e progressão da doença. Estudos estes que podem contribuir para a definição de prioridades nos programas de luta contra a tuberculose.

Quando se fala de tuberculose estamos a referir-nos a micobactérias que pertencem ao MTBC<sup>9</sup>. Este complexo compreende as espécies *M. tuberculosis*, que inclui *M. tuberculosis*, *M. bovis* (entre os quais se encontra a estirpe vacinal *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti*. A diferenciação entre os membros do MTBC é de extrema importância, uma vez que

this moment on and for future generations a threat which merits careful evaluation<sup>8</sup> as, with the prolonging of the transmission phase, there is the possibility of these strains re-infecting people even when they are under anti-tuberculosis cover against a drug-sensitive strain<sup>10,11</sup> and also due to the characteristics of the latent infection phase. In the case of infection by *M. tuberculosis*, this phase could be particularly long.

In Portugal, there is still a scarcity of studies based on the genotyping of the MTBC strains. What there is, however, is extremely useful in determining the epidemiology of tuberculosis by identifying the disease's distribution factors, both temporal and geographical, the transmission factors and the disease's manifestation and progression. Studies such as these could contribute to defining the priorities to be set in campaigns against tuberculosis.

In terms of tuberculosis, we refer to the microbacteria which belong in the MTBC<sup>9</sup>. This complex comprises the *M. tuberculosis* species, which includes the *M. tuberculosis*, *M. bovis* (among which is the vaccine strain *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti* and the *M. canetti*. The differentiation among the members of the MTBC is an extremely important one, in that it allows a more focused treatment to be disseminated and breaks the chain of transmission of the disease.

Molecular technology has completely changed the face of laboratory diagnosis of tuberculosis, meaning a better and quicker identification of the members of the MTBC can be made and also the differentiation of these into genotypic families. This differentiation is coming more

permite instruir uma terapêutica mais orientada e quebrar a cadeia de transmissão da doença.

A tecnologia molecular alterou por completo o diagnóstico laboratorial da tuberculose, permitindo uma melhor e mais rápida identificação dos membros do MTBC e a diferenciação deste em famílias genotípicas. Esta diferenciação assenta cada vez mais sobre técnicas baseadas em biologia molecular, que permitem uma melhor e mais rápida identificação das micobactérias. As novas técnicas de biologia molecular mostraram que o MTBC é mais vasto do que anteriormente se pensava. Talvez o *Spoligotyping* tenha sido a técnica que mais contribuiu nesta área, visto que permitiu o agrupamento dos *Spoligotypes* por famílias genotípicas.

O *Spoligotyping* facilita a diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis*, tem um bom nível de diferenciação para a análise epidemiológica, mas também é útil na determinação da origem geográfica das estirpes pela existência de um banco de dados internacional, o qual permite uma comparação a este nível<sup>5-7</sup>.

O *Spoligotyping*, é uma técnica 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<sup>2-4</sup>. O locus DR é uma região cromossómica 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

and more to be centred on molecular biology based techniques, allowing a better and faster identification of the microbacteria. The new molecular biology techniques show that the MTBC is a lot bigger than was previously believed. It is entirely possible that *Spoligotyping* has been the technique which has contributed the most in this field, seeing that it allows the *Spoligotypes* to be grouped into genotypic families.

*Spoligotyping* make it easier to differentiate between the species of the *M. tuberculosis* complex and has a good level of differentiation for epidemiological analysis. In addition it is useful in determining the geographical origin of strains, via the existence of an international data bank which allows comparisons to be made at this level<sup>5-7</sup>.

*Spoligotyping* is a genotyping technique for the *M. tuberculosis* complex. It is based on PCR methodology and analysis of a chromosome region specific to the complex, the DR (*Direct Repeats*) locus, through determining the absence or presence of specific spacers between the DR sequences<sup>2-4</sup>. The DR locus is a chromosome region which contains in a varying number a short DR sequence of 36 base pairs. This sequence is separated by non-repetitive spacers, also short sequence, of 35 to 41 base pairs. The technique detects the presence or absence of 43 DR locus spacers of a known sequence. The PCR is carried out using primers based on the DR and the DNA sequence of the spacers is amplified. After that it is detected by hybridization with oligonucleotides representing the sequences which are specific to the spacers. This explains the *Spoligotyping* name

---

**A diferenciação entre os membros do MTBC é de extrema importância, uma vez que, permite instruir uma terapêutica mais orientada e quebrar a cadeia de transmissão da doença**

---

**O Spoligotyping facilita a diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis***

---

**O Spoligotyping, é uma técnica de genotipagem do complexo *M. tuberculosis***

---

**Notável variabilidade genética a nível dos isolados clínicos do MTBC dos doentes**

---

**A análise por Spoligotyping, que permite a correlação entre o genótipo e a distribuição geográfica da doença, pode fornecer elementos sobre a circulação da tuberculose**

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 de *Spoligotyping - Spacer oligonucleotide typing*.

O estudo, que decorre desde 1999, é um estudo populacional de natureza retrospectiva a partir dos isolados do MTBC provenientes de doentes de tuberculose do Hospital Fernando Fonseca.

O presente trabalho confirma a notável variabilidade genética a nível dos isolados clínicos do MTBC dos doentes do Hospital Fernando Fonseca<sup>1</sup>.

Foram detectados ST raros, não identificados na base de dados internacional, que representam 8,4% dos isolados acomodados em onze ST (Quadro II). A detecção de ST raros pode estar relacionada com uma transmissão epidemiológica, alertando para a necessidade de proceder ao estudo da relação clonal entre as estirpes, sendo possível uma associação à MDR ou ao VIH.

Deparamos com particularidades relativas as estirpes isoladas no nosso país devido à elevada prevalência de ST que não foram classificados em famílias genotípicas<sup>6,7</sup>. É o caso dos ST244, ST150 e ST389 que representam 13,3 % do total dos isolados (Quadro III). Esta ideia não é estranha, visto a existência de família de estirpes com características nacionais terem sido assinaladas em estudos prévios<sup>12-14</sup>.

A análise por *Spoligotyping*, que permite a correlação entre o genótipo e a distribuição geográfica da doença, pode for

- "*Spacer oligonucleotide typing*".

This study has been running since 1999 and is a retrospective populational study into the isolates of MTBC of tuberculosis patients at the Fernando Fonseca Hospital. This study confirms the remarkable genetic variety of the clinical isolates of the MTBC patients at the Fernando Fonseca Hospital<sup>1</sup>.

Rare STs were detected which were not identified on the international data base, representing 8.4% of the isolates fitting into eleven STs (Table II). The detection of rare STs could be connected with the epidemiological transmission, raising awareness of the need to carry out a study of the clonal relationship between the strains, as an association with MDR or HIV is possible.

We found particularities relative to the isolate strains in Portugal due to the high prevalence of STs which were not classified into genotypic families<sup>6,7</sup>. This is the case of the ST244, ST150 and ST389 strains which make up 13.3 % of the total amount of isolates. (Table III). This is not startling given that the existence of families of strains with national characteristics has been seen in previous studies<sup>12-14</sup>.

*Spoligotyping* analysis, which allows the genotype and the geographical distribution of the disease to be correlated, can supply us with details of the spread of tuberculosis. In this study, we identified for the first time in Portugal two clinical isolates of *M. africanum* of a genotypic family Afri1, originating in Africa<sup>15</sup>. This information is also of particular importance for the field of tropical medicine and understanding the growth of tuberculosis<sup>16</sup>. Two isolates of *M. tuberculosis* of Asiatic



necer elementos sobre a circulação da tuberculose. Neste estudo identificamos pela primeira vez no país dois isolados clínicos de *M. africanum* de uma família genotípica Afri1 de origem africana<sup>15</sup>. Este resultado também é de uma importância notável, do ponto de vista da medicina tropical e no contexto da evolução da tuberculose<sup>16</sup>. Dois isolados de *M. tuberculosis* de origem asiática, pertencendo à família CAS1, tinham sido identificados desde o estudo precedente<sup>1</sup>. Estes casos confirmam a muito recente importação destas estirpes, visto serem respectivamente de 2003 por Afri1 e de 2002 por CAS1.

Assinalamos o problema da importação, desde 1999, de *M. tuberculosis* da família Beijing (ST1). Esta família clonal, relativamente recente, é considerada emergente<sup>17</sup>. É conhecida pela sua possível associação à vacinação por BCG<sup>18</sup>, também à multirresistência<sup>19</sup>, e possui uma aparente e documentada vantagem selectiva em relação a outras famílias do complexo *M. tuberculosis*<sup>18</sup>. O facto de a família Beijing (ST 1), que representava 1,4 % do total dos isolados no estudo precedente<sup>1</sup>, ter passado a representar 2,2% no estudo actual, poderá ser significativo, correspondendo a um problema emergente no nosso país decorrente da recente imigração de populações asiáticas e da Europa Oriental.

Para além do Beijing, outros genótipos conheceram entre 2001 e 2003 um aumento da frequência relativa, ST150 e ST389, cujo significado da evolução ainda não é conhecido.

Contudo, as frequências relativas dos *Spoligotypes* predominantes da família LAM, 24,8%, T1, 6,6%, e Haarlem, 7,1%, mantiveram-se relativamente estáveis.

origin belonging to the CAS1 family have been identified since the previous study<sup>1</sup>. These cases confirm the very recent importing of these strains: Afri1 in 2003 and CAS1 in 2002.

We would like to draw attention to the fact that the *M. tuberculosis* strain of the Beijing family (ST1) has been imported since 1999. This relatively recent clonal family is considered as emerging<sup>17</sup>. It is known due to its possible association with the BCG vaccination<sup>18</sup>. It is multi-drug resistant<sup>19</sup> and has an apparent selective and documented advantage over other *M. tuberculosis* complex families<sup>18</sup>. The fact that the Beijing (ST 1) family, which represents 1.4 % of the total number of isolates in the previous study<sup>1</sup>, now equals 2.2% in this study could be significant, corresponding to a problem emerging in Portugal in tandem with recent immigration of Asiatic and Eastern European populations.

In addition to the Beijing family, ST150 and ST389 are other genotypes which have had a relative increase in frequency between 2001 and 2003. The significance of this growth is as yet unknown.

Overall, the relative frequency of the *Spoligotypes* is to be found in the LAM family (8%), T1 (6.6%) and Haarlem (7.1%), meaning that they are relatively stable.

These are the first studies of this type undertaken in Portugal. They will certainly give rise in the near future to a deeper understanding of the tuberculosis situation in this country.

### Acknowledgements

Our thanks are due to Prof. Hugo L. David, Honorary Professor of the Pasteur

Estes são os primeiros estudos desta natureza no nosso país

Estes são os primeiros estudos desta natureza no nosso país, que certamente darão origem, no futuro próximo, a uma mais profunda compreensão sobre a situação da tuberculose no país.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Hugo L. David, Professor Honorário do Instituto Pasteur de Paris, 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. Agradecemos a Christophe Sola e a Nalin Rastogi (Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, Guadeloupe), por terem partilhado connosco a sua SpolDB3.0, base de dados de *Spoligotype*. Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação Calouste Gulbenkian e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

### Bibliografia/Bibliography

1. David S, Portugal C, Antunes A, Cardoso A, Calado A, Barros V, Sancho L. Identificação molecular pelo método de *Spoligotyping* de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Hospital Fernando Fonseca. Rev Port Pneumol 2004; X(3):195-204.
2. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JDA, 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.
3. Groenen PMA, Bunschoten AE, Van Soolingen D, Van Embden JDA. 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.
4. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tu-

Institute in Paris, and his support and suggestions during the course of this research. We would like to thank also Prof. Leonard Amaral, director of the Microbacteriology Teaching and Research Unit at the Hygiene and Tropical Medicine Institute for his interest in this work. We thank Christophe Sola and Nalin Rastogi (Tuberculosis and Microbacteria Unit, Pasteur Institute of Guadeloupe, Guadeloupe) for sharing with us their SpolDB3.0, *Spoligotype* data base. This research was partially financed by the Calouste Gulbenkian Foundation and by the Foundation for Science and Technology.

- berculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249(1): 1-26.
5. [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola\\_data.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm)
6. Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Anh DD, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniowski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Kallenius G, Kassa-Kelembho E, Koivula T, Ly HM, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Mostrom P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasolof-Razanamparany V, Ridell M, Rossetti ML, Stauffer F, Suffys PN, Takiff H, Texier-Maugein J, Vincent V, De Waard JH, Sola C, Rastogi N. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(11):1347-9.
7. Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, 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.
8. Bosne-David S, David HL. Estrategia clinico-laboratorial frente à tuberculose multirresistente. *Rev Port Doenças Infecciosas.* 1998; 21 (12):45-53.
9. Direcção Geral de Saúde (Fevereiro 2004). Programa nacional de luta contra a tuberculose; ponto da situação e desempenho; ano 2003. <http://www.dgsaude.pt/upload/membro.id/ficheiros/i006111.pdf>
10. Riviero A, Marquez M, Santos J, Pinedo A, Sanchez MA, 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):159-161.
11. Theisen A, Reichel C, Rüsck-Gerdes S, Haas WH, Rockstroh JK, Spengler U, Sauerbruch T. Mixed-strain infection with a drug-sensitive and multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1995; 345(8963):1512.
12. Covas MJ, Brum L, Portugal I, Bernardo JL, 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.
13. Hannan MM, Peres H, Maltez F, Hayward AC, Machado J, Morgado A, Proenca R, Nelson MR, Bico J, Young DB, Gazzard BS. Investigation and control of a large outbreak of multi-drug resistant tuberculosis at a central Lisbon hospital. *J Hospital Infect* 2001; 47:91-97.
14. Portugal I, Covas MJ, 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):207-213.
15. 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 Microbio* 2001; 39(1):57-65.
16. David HL, Jahan TM, Jumin A, Grandry J, Lehman EH. Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *Int J Systematic Bacterio.* 1978; 467-472.
17. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, Van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(8):843-849.
18. Van Soolingen D, Qian L, De Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing Hz, Enkhsaikan D, Nymadawa P, Van Embden JD. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33(12):3234-3238.
19. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, Van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(8):843-849.