

Do Laboratório à Prática Clínica

From Laboratory to Clinical Practice

Susana David¹

Utilização estratégica da genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* no controlo da tuberculose

Strategical use of genotyping of Mycobacterium tuberculosis in tuberculosis control

Recebido para publicação/received for publication: 08.01.30

Aceite para publicação/accepted for publication: 08.03.26

Resumo

A situação da tuberculose em Portugal justifica a aplicação de uma estratégia de genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis*, tanto mais que Portugal encontra-se inserido no contexto global de mobilidade das populações humanas e das suas consequências sobre a pandemia.

Vários estudos internacionais posicionam as técnicas do *spoligotyping* e *MIRU-VNTR typing* como de primeira linha na epidemiologia molecular do *M. tuberculosis* por estarem baseadas em tecnologias simples (PCR) e produzirem padrões, podendo ser traduzidos em código numérico de interpretação directa. Assim, tem sido proposta a aplicação do *spoligotyping* a todos os isolados clínicos, enquanto o *MIRU-VNTR typing* seria aplicado aos isolados com *spoligotype* comum. Outras técnicas, incluindo o IS6110-RFLP, seriam reservadas a aplicações segundo critérios seleccionados.

Os trabalhos anteriores em Portugal utilizando o *spoligotyping* apontaram para a vantagem de uma estratégia

Abstract

The tuberculosis situation in Portugal justifies the use of a strategy for the genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*, particularly as Portugal is part of the global backdrop of human mobility, something which has a knock-on effect on the pandemic.

Several international studies have placed *spoligotyping* and *MIRU-VNTR typing* as first line techniques for the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* as these techniques rely on simple technologies (PCR) and produce patterns which are easily translated into a direct interpretation numerical code. *Spoligotyping* has been accordingly proposed for all the isolates, while *MIRU-VNTR typing* should be applied to isolates with a common *spoligotype*. Other techniques, including IS6110-RFLP, should be reserved for use in accordance with selected criteria.

Previous studies in Portugal using *spoligotyping* have underlined the advantages of a strategy based

¹ Investigadora Principal
Centro de Tuberculose e Micobactérias
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Rua do Campo Alegre 823, 4150-180 Porto
Email: sdavid@ibmc.up.pt

gia de genotipagem baseada numa amostragem consecutiva e sem critério de pré-selecção. Esta permite a caracterização da estrutura populacional do *M. tuberculosis* através do conhecimento da distribuição dos genótipos geograficamente, no tempo e dentro dos vários grupos de risco.

Por outro lado, a associação do *spoligotyping* com o MIRU-VNTR *typing* e, eventualmente, outras técnicas, deverá ser avaliada em vários contextos, como na identificação de situações de transmissão recente, na distinção entre episódios de reinfeção e recaída, na caracterização da amplitude e dinâmica de transmissão da doença.

A solução do problema da tuberculose em Portugal passa por uma estruturação na utilização da genotipagem em apoio à luta contra a tuberculose, a ser avaliada através de exemplos e resultados concretos.

Rev Port Pneumol 2008; XIV (4): 509-516

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Epidemiologia molecular, genotipagem.

on sampling consecutive patient isolates with no prior selection criteria. This allows characterisation of the *M. tuberculosis* population structure through monitoring the distribution of the genotypes geographically over time and within the various risk groups.

On the other hand, the association of *spoligotyping*, MIRU-VNTR (typing and, possibly, other techniques, needs evaluating as part of bigger pictures, including identifying recent transmission situations, distinguishing between reinfection and relapse episodes and mapping the size and dynamics of disease transmission.

The solution to the tuberculosis problem in Portugal implies structuring genotyping's role in tuberculosis prevention and control and its evaluation through concrete examples and results.

Rev Port Pneumol 2008; XIV (4): 509-516

Key-words: *Mycobacterium tuberculosis*, molecular epidemiology, genotyping.

Introdução

A utilização da genotipagem no controlo da tuberculose passa pelo conhecimento da distribuição de genótipos do *Mycobacterium tuberculosis* geograficamente e dentro dos vários grupos de risco.

O esforço resultante de vários grupos de investigação, nomeadamente dos centros de referência europeus para a tuberculose e da própria Sociedade Europeia de Micobacteriologia (ESM, <http://www.esmycobacteriology.eu>), conduziram ao desenvolvimento de novas metodologias de genotipagem¹⁻¹⁶, e em 2004 à iniciação pelos Estados Unidos,

através do CDC de um programa global de aplicação da genotipagem do *M. tuberculosis* na prevenção e controlo da tuberculose (<http://www.cdc.gov/nchstp/tb/genotyping/toc.htm>). A nível europeu, encontra-se em curso a elaboração de novas recomendações a este nível.

Esta evolução foi possível pela introdução e standardização internacional de novos métodos de genotipagem o *spoligotyping* e *variable number of tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units typing* (MIRU-VNTR *typing*). Estes métodos, produzindo padrões simples, podendo ser tra-

duzidos em código numérico de interpretação directa, facilitaram a padronização internacional e a constituição de importantes bases de dados onde estão representados genótipos de isolados provenientes de centenas de países em todo o mundo, tal como a versão mais actual da base de dados internacional de spoligotypes a SpolDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT-demo>). O *spoligotyping* e MIRU-VNTR *typing*, por estarem baseadas em tecnologias simples (PCR), também apresentam vantagens técnicas e financeiras que as levaram a serem posicionadas como de primeira linha em relação à técnica de genotipagem por análise de ADN genómico total (IS6110-RFLP).

Actualmente, nos Estados Unidos, foi proposta a aplicação do *spoligotyping* e MIRU-VNTR *typing* em todos os isolados clínicos. A situação da tuberculose em Portugal justifica a aplicação de uma estratégia de genotipagem do bacilo da tuberculose, tanto mais que Portugal também se encontra inserido no contexto global de mobilidade das populações humanas e das suas consequências sobre a pandemia. Neste contexto, é importante considerar o papel do país nos descobrimentos e na colonização de territórios em vários continentes; na história contemporânea, a mobilidade dos portugueses através da emigração; e, mais recentemente, o facto de Portugal também se ter tornado um país de imigração.

Até recentemente, as bases de dados internacionais, caracterizadas por uma vasta informação quanto à variedade genética do complexo *M. tuberculosis* e conhecimento preciso da distribuição geográfica a nível mundial, ignoravam a realidade portuguesa. Foi através do trabalho que tem vindo a ser desen-

volvido que foram introduzidos genótipos de isolados portugueses na base de dados SpolDB4¹⁷⁻²⁰. Este trabalho evidenciou vários genótipos de aparente especificidade portuguesa e o aparecimento regular de estirpes de possível origem asiática, africana, da Europa de Leste e de outros países, e constituiu uma primeira tentativa de caracterização da estrutura populacional dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* em Portugal. Por outro lado, a análise temporal dos dados não deixou de preocupar ao constatar que certos genótipos têm vindo a aumentar, como os pertencendo à família genotípica Beijing reconhecido pela sua elevada virulência^{21,22}, e que outros concentram um grande número de estirpes multirresistentes. A monitorização de tais situações é de uma importância considerável na luta contra a tuberculose.

A solução do problema da tuberculose em Portugal passa por uma estrutura que permita a aplicação da genotipagem do bacilo da tuberculose no apoio à luta contra a tuberculose, adoptando, à imagem estratégica internacional, uma visão com orientação para a prevenção.

Identificação de situações de transmissão recente

Exemplos não faltam demonstrando a aplicação destas tecnologias na identificação de doentes envolvidos em episódios de transmissão recente (<http://www.cdc.gov/nchs-tp/tb/genotyping/toc.htm>) e que também estão na base da caracterização da amplitude e da dinâmica de transmissão da doença. A aplicação estratégica da genotipagem pode contribuir para a detecção atempada de surtos, a detecção de situações de transmissão não suspeitas, a monitorização da circulação

Nos Estados Unidos, foi proposta a aplicação do spoligotyping e MIRU-VNTR typing em todos os isolados clínicos

de estirpes, a avaliação de investigações de contacto, a detecção facilitada de falsos positivos e a distinção entre episódios de reinfecção e recaída. Nestes estudos, o contributo dos epidemiologistas e clínicos também é fundamental no estabelecimento da cadeia de transmissão.

Manter uma amostragem sem critério de pré-selecção parece ser a melhor maneira de detectar e identificar situações não previstas de transmissão recente. No entanto, salientamos a importância de monitorizar a tuberculose multirresistente e a tuberculose em grupos de maior risco (residentes em lares, toxicodependentes, profissionais de saúde, doentes VIH, etc.), introduzindo estudos com base em critérios de pré-selecção.

Caracterização da estrutura populacional do *M. tuberculosis*

O *spoligotyping* permitiu a subdivisão do *M. tuberculosis* em nove famílias de *spoligotype*: *M. africanum*, *M. bovis* (incluindo o *M. bovis* BCG), East African-Indian (EAI), Beijing, Haarlem, Latin American and Mediterranean (LAM), Central and Middle Eastern Asian (CAS), uma família europeia X, e uma família pouco definida T¹⁶. Estas foram ainda subdivididas em subfamílias. A utilidade na classificação de estirpes de *M. tuberculosis* segundo a família de *spoligotype* tem vindo a ser reconhecido pela sua força de sugestão, nomeadamente de cenários de transmissão e pelo delinear imediato de alvos de estudo e de intervenção²³.

O *spoligotyping* aplicado com base numa amostragem sistemática, consecutiva e sem critério de pré-selecção, permite a caracterização da estrutura populacional do *M. tuberculosis*. Como tal, constitui uma base para a

comparação regional e internacional de genótipos e tentativas de monitorização da circulação de estirpes, nomeadamente entre países vizinhos ou culturalmente e economicamente relacionados, tais como, por exemplo no caso de Portugal, Espanha, Brasil e PALOP, etc., através do estudo da distribuição geográfica e de alterações temporais. Nestes termos, a abordagem através de estudos populacionais contribui para fundamentar uma visão global da situação relativa à tuberculose.

Estratégia de genotipagem do *M. tuberculosis*

O objectivo da elaboração de uma estratégia de aplicação da genotipagem do bacilo da tuberculose baseada em estudos populacionais a partir dos isolados clínicos será que esta conduza a uma visão global da situação e contribua para à compreensão da dinâmica relativa à tuberculose.

Esta pressupõe um número de requisitos que incluem: 1) a colecção de estirpes; 2) a compilação de dados; 3) a aplicação sistemática do *spoligotyping* a todos os isolados; 4) a aplicação do MIRU-VNTR *typing* a todos os isolados com *spoligotype* comum.

A colecção de estirpes

A conservação dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* através da criação de um banco de estirpes é um pré-requisito que constituirá uma ferramenta valiosa para estudos de genotipagem, e inclusivamente para a selecção de estirpes-padrão úteis em estudos comparativos internacionais e em estudos multicêntricos e de controlo de qualidade.

O *spoligotyping* permitiu a subdivisão do *M. tuberculosis* em nove famílias de *spoligotype*

As estirpes poderão ser conservadas em condições óptimas para gerar novas culturas ou para a extracção de ADN sob forma de suspensão aquosa, com uma densidade pelo menos comparável ao padrão McFarland 1, a manter entre -20.°C e -80.°C.

Compilação de dados

A aplicação de técnicas de genotipagem do bacilo da tuberculose na caracterização da estrutura populacional do agente e na resolução de situações de transmissão recente requer a compilação de dados bacteriológicos no âmbito da epidemiologia molecular (*spoligotyping*, MIRU-VNTR *typing*, IS6110-RFLP) e do diagnóstico (baciloscopia quantificada, resistência aos antibióticos etc.), e dados clínico-epidemiológicos (história prévia de tuberculose; origem geográfica; identificação do grupo de risco, etc.). Para os estudos de situações concretas, dados complementares poderão ser necessários.

A concepção de bases de dados podendo ser articuladas entre vários parceiros facilitando a associação do genótipo do isolado clínico com dados clínicos ou epidemiológicos é um desenvolvimento importante nesta área de trabalho.

Aplicação do *spoligotyping* a todos os isolados

O *spoligotyping*, pela sua acessibilidade, está particularmente adaptado a estudos em grande escala. Para além de facilitar o diagnóstico diferencial do complexo *M. tuberculosis*, esta técnica está na origem de estudos sobre a distribuição geográfica dos genótipos^{3,4,8,16} que, do ponto de vista científico, orienta actualmente esforços na tentativa da monitorização da circulação de estirpes

(tanto a nível internacional como nacional e regional) e na tentativa de associação de genótipos ao conceito de adaptabilidade e virulência.

A técnica de *spoligotyping* está baseada na amplificação da região Direct Repeat (DR) e da subsequente hibridação dos produtos amplificados com oligonucleótidos complementares às regiões dos espaçadores variáveis localizados entre as sequências DR^{18-20,24,25}. A detecção dos oligonucleótidos realiza-se através de hibridação *southern blot* utilizando uma membrana na qual os oligonucleótidos dos espaçadores se encontram covalentemente ligados. A detecção dos sinais da hibridação permite a definição dos *spoligotypes* pela presença ou ausência de um ou mais espaçadores.

Aplicação do MIRU-VNTR *typing* a todos os isolados com *spoligotype* comum

A associação das técnicas, MIRU-VNTR *typing* e *spoligotyping* têm revelado para a maioria dos casos um poder discriminatório comparável com o IS6110-RFLP. Enquanto o IS6110-RFLP, pelo facto de produzir um padrão complexo que implica a utilização de *software* sofisticado e dificulta a comparação interlaboratorial, passou a ser considerado como em fim de linha unicamente para a discriminação entre padrões idênticos pelas duas técnicas PCR ou para confirmação de suspeita, através de dados de natureza epidemiológica, de transmissão recente.

A técnica do MIRU-VNTR *typing* baseada no número variável de repetições em tandem de várias classes de unidades repetitivas (*variable number of tandem repeats of mycobacte-*

O *spoligotyping*, pela sua acessibilidade, está particularmente adaptado a estudos em grande escala

rial interspersed repetitive units typing) está baseada na amplificação por PCR e utiliza *primers* específicos das regiões flanqueadoras de múltiplos *loci* para a determinação do número de cópias dos MIRU-VNTR através da análise do tamanho dos produtos de amplificação^{11,12}. O sistema mais utilizado consiste num conjunto de 12 *loci*¹² e foi integrado no sistema de controlo epidemiológico à escala nacional nos Estados Unidos (<http://www.cdc.gov/nchstp/tb/genotyping/toc.htm>). Mais recentemente, um conjunto optimizado de 24 *loci* foi definido, incluindo um subgrupo de 15 *loci* específico para investigações de natureza epidemiológica¹¹.

Avaliação através de estudos operacionais
 Importa ainda salientar que a aplicação de uma estratégia na utilização da genotipagem do *M. tuberculosis* no apoio à luta contra a tuberculose requer avaliação. Esta passa por uma importante coordenação em que a orientação deverá ter apoio numa visão global da tuberculose, onde a índole laboratorial é fundamental. A análise operacional a vários níveis, baseada em estudos e resultados concretos, será de uma importante contribuição para a elaboração de uma estratégia nacional.

Repercussões em estudos de investigação aplicada, fundamental

A integração de dados de natureza bacteriológica, clínica e epidemiológica, constitui uma base para estudos de investigação aplicada e fundamental, onde é possível prever importantes contributos em apoio à orientação de programas de luta contra a tuberculose. De facto, estes estudos facilitam a

associação de genótipos à resistência anti-biótica e à multirresistência e conduzem a noções de adaptabilidade de genótipos e de como estes podem contribuir para a dinâmica da tuberculose, bem como para a sua eventual implicação na manifestação clínica, resposta terapêutica, etc.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Rui Appelberg o apoio e a disponibilização de espaços no seu laboratório do IBMC, durante a realização deste manuscrito, e à Fundação Calouste Gulbenkian o apoio no desenvolvimento desta linha de investigação.

Bibliografia

1. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuno L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaia O, Ngeow YF, Neumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolof-Razanamparany V, Rasolonalona T, Rossetti ML, Rusch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 23-39.
2. Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, Crawford JT Evaluation of a Two-Step Approach for Large-Scale, Prospective Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the United States. J Clin Microbiol 2005; 43: 688-95.

A aplicação de uma estratégia na utilização da genotipagem do *M. tuberculosis* no apoio à luta contra a tuberculose requer avaliação

3. Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Dang DA, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniewski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Kassa-Kelembho E, Ho ML, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Mostrom P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasolofo-Razanamparany V, Ridell M, Rossetti ML, Stauffer F, Suffys PN, Takiff H, Texier-Maugein J, Vincent V, de Waard JH, Sola C, Rastogi N. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1963-70.
4. 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, Drobniewski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Kallenius G, Kassa-Kelembho E, Koivu T, Ly HM, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Mostrom P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasolofo-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; 8:1347-9.
5. Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2520-4.
6. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
7. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1901-6.
8. 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: 390-6.
9. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 2003; 3: 125-33.
10. Sun YJ, Lee AS, Ng ST, Ravindran S, Kremer K, Bellamy R, Wong SY, van Soolingen D, Supply P, Paton NI. Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5058-64.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498-510.
12. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3563-71.
13. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-9.
14. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2578-86.
15. Wilson SM, Goss S, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3385-8.

16. Sebban M, Mokrousov I, Rastogi N, Sola C. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics* 2002; 18: 235-43.
17. David S, Raposo Ribeiro D, Antunes A, Portugal C, Sancho L, Germano de Sousa J. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infect Genet Evol* 2007; 7: 609-17.
18. David S, Barros V, Portugal C, Antunes A, Cardoso A, Calado A, Sancho L, Germano de Sousa J. Novos dados sobre o Spoligotyping de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Hospital Fernando Fonseca (Amadora-Sintra, Portugal). *Rev Port Pneumol* XI 2006; 6: 513-31.
19. David S, Portugal C, Antunes A, Calado A, Cardoso A, Barros V, Sancho L, Germano de Sousa J. Spoligotyping e polimorfismo do gene *pncA* um cenário em duas etapas para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em Portugal. *Rev Port Pneumol* XI 2006; 6: 533-56.
20. 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* X 2004; 3:195-204.
21. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002; 10: 45-52.
22. Drobniowski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetsov S, Zakharova, S Melentyev A, Fedorin I. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA* 2005; 293: 2726-31.
23. Vitol I, Driscoll J, Kreiswirth B, Kurepina N, Bennett KP. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. *Infect Genet Evol* 2006, 6: 491-504.
24. 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: 2734-40.
25. 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; 10:1057-65.