

Suzana David^{*}
Clara Portugal^{**}
Abílio Antunes^{***}
Ana Calado^{*}
Ângela Cardoso^{*}
Vanessa Barros^{*}
Luísa Sancho^{**}
José Germano de Sousa^{**}

Spoligotyping e polimorfismo do gene *pncA*: Um cenário em duas etapas para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em Portugal

Spoligotyping and *pncA* polymorphisms: A two step scenario for *Mycobacterium bovis* diagnosis in Portugal

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

Resumo

O diagnóstico diferencial do *Mycobacterium bovis* é importante no controlo da transmissão para a população humana e também no tratamento da doença, visto que o *M. bovis* é naturalmente resistente à pirazinamida. Foram analisados onze isolados clínicos do Hospital Fernando Fonseca, com um padrão de *Spoligotype* indicativo de *M. bovis* pela ausência dos espaçadores 39-43, mas que também contaram com a ausência do espaçador 38. Para a identificação destas estirpes procedeu-se à análise fenotípica da resistência à pirazinamida e estudo dos polimorfismos dos genes *pncA* e *gyrB*. Pelo estudo do polimorfismo do *pncA*, verificámos

Abstract

The differential diagnosis of *Mycobacterium bovis* is important in the control of transmission to the human population and also for treatment since *M. bovis* is naturally resistant to pyrazinamide. Eleven clinical isolates from the Fernando Fonseca Hospital with *Spoligotypes* indicative of *M. bovis*, through the absence of spacers 39-43 but that also counted with the absence of spacer 38, were analyzed. For the identification of these strains, the phenotypic analysis of pyrazinamide resistance and study of the polymorphisms of the *pncA* and *gyrB* genes were carried out. The study of the *pncA* polymorphism revealed that the strains analyzed did not contain

^{*} 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.

^{**} Serviço de Patologia Clínica, Hospital Fernando Fonseca, Amadora/*Clinical Pathology Department, Fernando Fonseca Hospital, Amadora.*

^{***} UEI de Clínica e Doenças Tropicais/IHMT/UNL, Lisboa/*TRU of the Tropical Diseases Clinic, HTMI, NUL, Lisbon.*

Correspondência/Correspondence to: Suzana David, UEI de Micobacteriologia, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Rua da Junqueira, 96; 1349-008 Lisboa, Portugal
Tel.: +351-21-3652600; Fax: +351-21-3632105; E-mail: suzanadavid@ihmt.unl.pt

que as estirpes analisadas não continham a mutação específica do *M. bovis*. Em relação aos polimorfismos do *gyrB*, utilizando o *kit* GenoType® MTBC, as estirpes foram identificadas como pertencentes ao grupo *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtipo II e *M. canetti*. O presente trabalho de investigação permitiu-nos definir novos génotipos sobre os quais deverão apoiar-se estudos bacteriológicos futuros. Entre estes foi desde já considerado importante o estudo do polimorfismo do gene *pncA*, devido às implicações de utilidade prática e imediata para o clínico. Avaliar a transmissão e definir grupos de risco é um objectivo para o qual se considera importante o apoio dos serviços veterinários.

Rev Port Pneumol 2005; XI (6): 533-556

Palavras-chave: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, Spoligotyping, *kit* GenoType® MTBC, *pncA*, *gyrB*, pirazinamida.

the *M. bovis* specific mutation. In relation the *gyrB* polymorphisms, using the GenoType® MTBC kit, the strains were identified as belonging to the group *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtipo II e *M. canetti*. The present investigation enabled us to define new genotypes on which future bacteriological studies should be based. Amongst these the study of the *pncA* polymorphism was considered important due to the immediate practical implications for the clinician. Evaluating transmission and defining groups of risk is an objective for which support from the veterinary services is considered relevant.

Rev Port Pneumol 2005; XI (6): 533-556

Key-words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium bovis*, Spoligotyping, *kit* GenoType® MTBC, *pncA*, *gyrB*, pyrazinamide.

O *Mycobacterium bovis* faz parte do complexo *M. tuberculosis* (MTBC)

O *M. bovis* tem um largo espectro de hospedeiros

Introdução

O *Mycobacterium bovis* faz parte do complexo *M. tuberculosis* (MTBC). Apesar da grande homologia do DNA em relação ao do *M. tuberculosis*, os dois organismos diferem significativamente na sua epidemiologia. Contrariamente ao *M. tuberculosis*, que infecta principalmente o homem, o *M. bovis*, agente da tuberculose bovina, tem um largo espectro de hospedeiros.

A incidência da doença humana por *M. bovis* foi significativamente reduzida nos países desenvolvidos desde a introdução da pasteurização do leite. No entanto, em

Introduction

Mycobacterium bovis belongs to the *M. tuberculosis* (MTBC) complex. Although its DNA is remarkably similar to that of *M. tuberculosis*, there is a great difference in the epidemiology of the two organisms. Unlike *M. tuberculosis*, which mainly infects man, *M. bovis*, bovine tuberculosis has a widespread spectrum of hosts.

The rate of human *M. bovis* disease has been significantly reduced in developed countries since the introduction of pasteurised milk. In spite of this, cases of *M.*

países europeus têm surgido casos de infecção por *M. bovis* geralmente associados à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana¹⁻³, mas também em idosos, em populações imigrantes, em indivíduos que pela profissão ou residência mantêm uma proximidade com animais infectados ou que pratiquem o consumo de leite cru^{4,5}. A erradicação da fonte da doença tem sido dificultada devido ao seu reservatório natural. O gado bovino é o reservatório principal, no entanto este inclui também outras espécies ligadas à agro-pecuária, como a cabra, o cavalo e o coelho; animais domésticos como o gato e o cão, e animais selvagens, como o veado, o texugo e os animais dos jardins zoológicos⁶⁻⁹.

Nos países onde coexistem tuberculose bovina e humana, a distinção entre as duas espécies é importante no controlo da transmissão do *M. bovis* à população humana, aspecto de particular relevância na instituição da terapêutica, visto que o *M. bovis* é naturalmente resistente à pirazinamida (PZA), um dos antibióticos de primeira linha utilizados contra a tuberculose. A utilização na rotina laboratorial de sondas comerciais (ACCUProbe; GenProbe, San Diego, Califórnia) facilita a identificação de isolados do MTBC, mas não permite a distinção entre as várias espécies do complexo (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*).

Hoje em dia, existem técnicas de genotipagem que podem ser úteis na distinção entre as várias espécies do complexo, nomeadamente o *M. bovis*, tais como o “*Spacer oligonucleotide typing*” (*Spoligotyping*), técnica que analisa os polimorfismos da região cromossómica DR (*Direct Repeats*) específica do MTBC¹⁰⁻¹². Outra técnica recentemente

bovis infection has been seen in European countries generally associated with infection by the virus to human immunodeficiency¹⁻³, but also in the elderly, in immigrant populations, in individuals whose profession or place of residence brings them into contact with infected animals or drinkers of non-pasteurised milk^{4,5}.

Eradicating the source of the disease has been made difficult due to its natural reservoir. While bovine cattle is the main reservoir, other species linked to livestock farming are also included. These include goats, horses, rabbits, domestic animals such as cats and dogs, wild animals such as deer, badgers and zoo animals⁶⁻⁹.

In the countries where bovine and human tuberculosis coexist, the distinction between the two species is important in the controlling of the *M. bovis* transmission to the human population. This is particularly important in starting therapy, seeing that *M. bovis* is naturally resistant to Pyrazinamide (PZA), one of the first line antibiotics used against tuberculosis.

Using commercial probes as part of laboratory routine (ACCUProbe; GenProbe, San Diego, Calif.) makes it easier to identify MTBC isolates but doesn't allow the distinction between the various complex species (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*) to be made. Today there are genotyping techniques which may be of use in distinguishing between the various species of the complex, particularly *M. bovis*, such as “*spacer oligonucleotide typing*” (*Spoligotyping*), a technique that analyses the polymorphisms of the DR (*Direct Repeats*) chromosome region specific to MTBC¹⁰⁻¹². Another recently developed technique is

Em países europeus têm surgido casos de infecção por *M. bovis* geralmente associados à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

O *M. bovis* é naturalmente resistente à pirazinamida (PZA)

Existem técnicas de genotipagem que podem ser úteis na distinção entre as várias espécies do complexo, nomeadamente o *M. bovis*

Tradicionalmente, a distinção fenotípica entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* apoia-se no estudo da susceptibilidade à PZA e da actividade da pirazinamidase

desenvolvida baseia-se no estudo dos polimorfismos do gene *gyrB* da subunidade B da girase do DNA^{13,14}.

Tradicionalmente, a distinção fenotípica entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* apoia-se no estudo da susceptibilidade à PZA e da actividade da pirazinamidase, visto que, contrariamente a *M. tuberculosis*, o *M. bovis* é naturalmente resistente à PZA e não tem actividade da pirazinamidase¹⁵. No entanto, alguns estudos evidenciaram susceptibilidade à PZA em isolados de *M. bovis*¹⁶⁻¹⁸. Por outro lado, a descoberta de uma mutação pontual na posição 169 do gene *pncA* da pirazinamidase associada à resistência à PZA e específica de *M. bovis* permitiu ainda o desenvolvimento de outras metodologias moleculares para a diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*¹⁸⁻²⁰.

Objectivo

Recentemente, evidenciamos em doentes de tuberculose do Hospital Fernando Fonseca uma elevada percentagem de isolados com um *Spoligotype* caracterizados pela ausência dos espaçadores 39 a 43, típico do *M. bovis*, mas que contavam também com a falta do espaçador 38²¹. O presente trabalho, no seguimento deste estudo, tem por objectivo a aplicação do *Spoligotyping* e o estudo dos polimorfismos dos genes *pncA* e *gyrB* na diferenciação destes isolados.

Materiais e métodos

Estirpes

Foram analisadas 11 estirpes com *Spoligotypes* caracterizadas pela ausência dos espaçadores 38 a 43. Estas estirpes foram oriundas de uma amostragem recentemente

baseado no estudo da *gyrB* polimorfismos na subunidade B do DNA^{13,14}.

Tradicionalmente, a distinção fenotípica entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* apoia-se no estudo da susceptibilidade à PZA e da actividade da pirazinamidase, visto que, contrariamente a *M. tuberculosis*, o *M. bovis* é naturalmente resistente à PZA e não tem actividade da pirazinamidase¹⁵. No entanto, alguns estudos evidenciaram susceptibilidade à PZA em isolados de *M. bovis*¹⁶⁻¹⁸.

Por outro lado, a descoberta de uma mutação pontual na posição 169 do gene *pncA* da pirazinamidase associada à resistência à PZA e específica de *M. bovis* permitiu ainda o desenvolvimento de outras metodologias moleculares para a diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*¹⁸⁻²⁰.

Aim

We recently discovered high percentages of spoligotype isolates in TB patients at the Fernando Fonseca Hospital, characterised by the absence of spacers 39 and 43, typical of *M. bovis* but also with missing spacer 38²¹. Following on from these findings, the current study aims to highlight the use of *Spoligotyping* and the study of polymorphisms in the genes *pncA* and *gyrB* in the differentiation of these isolates.

Materials and methods

Strains

Eleven strains with *Spoligotypes* characterized by absence of spacers 38 to 43 were studied. These strains came from a sample recently identified by *Spoligotyping* and comprising 219 isolates from patients admitted to the Fernando Fonseca Hospital between 1999 and 2002 with positive cul-

caracterizada por *Spoligotyping*, constituída por 219 isolados de doentes internados no Hospital Fernando Fonseca entre 1999 e 2002 (um isolado/doente) com cultura positiva identificados como pertencendo ao MTBC por GenProbe (ACCUProbe; GenProbe, San Diego, California)²¹. As estirpes foram isoladas a partir de produtos brônquicos, à excepção de dois casos desconhecidos.

Em todos os estudos, bacteriológicos e moleculares, foram igualmente incluídas estirpes-padrões utilizadas como controlos, *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG.

As estirpes foram conservadas sob a forma de suspensões em água destilada estéril a 80°C negativos.

Extracção do DNA bacteriano

Para os estudos por PCR, o DNA foi extraído da suspensão bacteriana preparada a partir da cultura em meio Lowenstein-Jensen, por aquecimento a 80°C durante 30 minutos (termólise).

Spoligotyping

A técnica de *Spoligotyping* foi efectuada segundo as recomendações do fabricante do *kit* membrana (Isogen Bioscience B.V., Maarsen, Netherlands), como previamente descrita²¹. Em linhas gerais, procedeu-se à extracção do DNA bacteriano, seguida 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

identificados segundo o MTBC por GenProbe (ACCUProbe; GenProbe, San Diego, California)²¹, com um isolado doente. As estirpes foram isoladas de produtos brônquicos, excepto em dois casos não classificados.

Em todos os estudos bacteriológicos e moleculares, foram igualmente incluídas estirpes-padrões utilizadas como controlos, *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG.

As estirpes foram conservadas sob a forma de suspensões em água destilada estéril a 80°C negativos.

Bacterial DNA extraction

For PCR analysis, DNA was extracted from the bacterial suspension prepared from the culture in the Lowenstein-Jensen medium by heating to 80°C for 30 minutes (thermolysis).

Spoligotyping

Spoligotyping was carried out in accordance with the recommendations of the membrane Kit manufacturer (Isogen Bioscience B.V., Maarsen, the Netherlands), as previously described²¹. In general terms, bacterial DNA is extracted, then the whole DR region is amplified and marked by PCR, using specific primers. Forty-three oligonucleotides, corresponding to the spacers between the DR sequences, were detected via “Southern Blot” hybridization using the membrane supplied with the Kit. Thus, the oligonucleotides of the 43 spacers were discovered to be covalently linked in a determined order, parallel to each other. PCR products, marked with biotin, were applied using a miniblottedter (Isogen Bioscience B.V., Maarsen, Netherlands) whose fissures are arranged

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 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, UK). A detecção dos sinais da hibridação foi obtida por exposição a uma película de autorradiografia Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences), permitindo a definição dos *Spoligotypes* pela presença ou ausência de um ou mais espaçadores.

Os dados foram analisados pelo programa *Excel* que permitiu a ordenação e agrupamento dos diversos *Spoligotypes*. A análise dos *Spoligotypes*, quando partilhados por mais de uma estirpe, designados STs (*shared types*), foi efectuada utilizando as bases de dados internacionais relativas ao MTBC²² e ao *M. bovis*²³.

Estudo da susceptibilidade aos antibióticos de primeira linha

O estudo da susceptibilidade aos antibióticos de primeira linha foi realizado segundo os critérios do plano laboratorial do Hospital Fernando Fonseca, em vigor entre os anos de 1999 e 2002. A técnica radiométrica em meio líquido do sistema Bactec™ 460TB (Becton Dickinson,

perpendicularly in relation to the pattern of lines of the oligonucleotides of the spacers. Hybridization was effected 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 hybridization was made by autoradiography film - Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) - which defines the *Spoligotypes* by the presence or absence of one or more spacers.

An Excel program was used to analyse the data derived. The program was designed to order and group the various *Spoligotypes*. Those common to more than one strain were called STs (shared types) and analysed using an international database relating to MTBC²² and *M. bovis*²³.

Research into the susceptibility of first line antibiotics

The study of susceptibility to first line antibiotics was carried out in accordance with laboratory criteria of the Fernando Fonseca Hospital in use between 1999 and 2002. The radiometric technique in liquid medium, Bactec™ system 460TB (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) was used as a basis to study the critical proportion of 1%. This is evaluated by comparing the growth in antibiotic presence with the increase in the Control without antibiotic, but receiving an initial inoculation 100 times more diluted - called control 1:100. When the growth index (GI) of the con-

Sparks, MD, USA) foi utilizada com base no estudo da proporção crítica de 1%. Esta é 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. Quando o índice de crescimento radiométrico (*growth index*, GI) do controlo 1:100 atinge o valor de 30, a leitura do GI é efectuada mais um dia. A diferença nos valores dos GI de um dia para o outro (DGI) é calculada entre estes dois dias consecutivos. O antibiótico é considerado eficaz se o crescimento bacteriano for reduzido de 99% ou mais em comparação com um frasco que recebeu o inóculo inicial mas sem adição de antibióticos. Em termos práticos, se o DGI do frasco com antibiótico é inferior ao DGI do controlo 1:100, as bactérias são consideradas susceptíveis, se for superior são consideradas resistentes. O fabricante fornece liofilizados dos antibióticos estreptomina, isoniazida, etambutol, rifampicina e PZA para utilização em meio 12B Bactec™, ou meio PZA Bactec™ no caso específico da PZA, na execução das provas de resistência segundo as suas instruções.

Método PCR alelo-específico para a análise do polimorfismo na posição 169 do gene *pncA*

O método PCR, utilizado na detecção do polimorfismo na posição 169 do gene *pncA*, baseia-se no princípio de que a reacção PCR só é possível com o máximo de emparelhamento entre o *primer* e o gene¹⁹.

Uma das formas para diferenciar os iso-

trolo 1:100 reaches a value of 30, the GI reading is made for another day. Differences in GI values from one day to another (DGI) are calculated between these two consecutive days. The antibiotic is considered effective if bacterial growth is reduced by 99% or more compared to a specimen that received the initial control without the addition of antibiotics. In practical terms, if the DGI of the specimen with antibiotic is less than the DGI of the control 1:100, the bacteria are considered susceptible. If more, they are considered resistant. The manufacturer supplied lyophilisates of the Streptomycin, Isoniazid, Ethambutomol, Rifampicin and PZA antibiotics to be used in the Bactec™ 12B method, or Bactec™ PZA method, in the specific PZA case, to undertake resistance tests according to their instructions.

Allele-specific PCR method for the analysis of polymorphisms on position 169 of the *pncA* gene

The PCR method, using detection of the polymorphism in position 169 of the *pncA* gene, is based on the principle that the reaction is only possible with the maximum matching between the primer and the gene¹⁹.

One way to differentiate *M. bovis* isolates is based on the fact that these stains have a natural polymorphism in the *pncA* gene. In this case due to the substitution in position 169 of this gene of the cytosine base (C), present in most *M. tuberculosis* isolates, with a guanine (G) base. This mutation is the origin of resistance to PZA.

The method uses a direct primer *pncATB*-1.2 (5'- atgcggcggtgatcatcgtc-3'), comple-

lados de *M. bovis* assenta no facto de que estas estirpes têm um polimorfismo natural no gene *pncA*. Neste caso, dá-se a substituição, na posição 169 deste gene, da base citosina (C) presente na maioria dos isolados de *M. tuberculosis* por uma base guanina (G). Esta mutação dá origem à resistência à PZA.

A técnica utilizada consiste na utilização de um *primer* directo pncATB-1.2 (5'-atgCGGGcgttgatcatcgtc-3') complementar das bases 1 a 21 do gene *pncA*, capaz de hibridar com o gene das duas espécies *M. bovis* e *M. tuberculosis*, e dois *primers* reverse, complementando as bases 185 a 168.

O *primer* reverse pncAMT-2 (5'-cgggtg cCGgagaagcCG-3'), foi construído para emparelhar unicamente com a sequência de *pncA* do *M. tuberculosis* e não com a do *M. bovis*. Este *primer* apresenta um único desemparelhamento (*mismatch*) no terceiro nucleótido da extremidade 3' (correspondente à posição 170 no gene).

Esta alteração no *primer* faz com que este não emparelhe com a sequência do gene *pncA* de isolados de *M. bovis*, uma vez que se está na presença de dois desemparelhamentos (um do *primer* e outro proveniente da mutação do gene *pncA* do *M. bovis*).

O *primer* reverse pncAMB-2 (5'-cgggtgCGgagaagcCG-3') tem dois desemparelhamentos com o gene do *M. tuberculosis* e um só com o de *M. bovis*. O resultado é que o par de *primers* pncATB-1.2 e pncAMB-2 permite a amplificação do gene de *M. bovis* e não de *M. tuberculosis*. As bases sublinhadas correspondem a modificações incluídas na sequência do *primer* e não complementam a sequência publicada para o gene. As bases em **negrito** complementam as presentes nas sequências de

mentary to bases 1 to 21 of the *pncA* gene, which is capable of forming hybrids with the gene of the two species *M. bovis* and *M. tuberculosis* and two reverse primers, complementing bases 185 to 168.

The reverse primer pncAMT-2 (5'-cgggtgCGgagaagcCG-3') was created to uniquely match with the sequence of the *pncA* of the *M. tuberculosis* and not with that of the *M. bovis*. This primer presents the only mismatch in the third nucleotide of extremity 3' (corresponding to position 170 on the gene).

This alteration in the primer is made as it does not match with the sequence of the *pncA* gene of the isolates of *M. bovis*, as it is in the presence of two mismatches (one of the primer and the other coming from the mutation of the *pncA* gene of the *M. bovis*).

The reverse primer pncAMB-2 (5'-cgggtgCGgagaagcCG-3') has two mismatches with the *M. tuberculosis* gene and only one with *M. bovis*. The result is that primer pairs pncATB-1.2 and pncAMB-2 allow amplification of the *M. bovis* gene and not the *M. tuberculosis*. The underlying bases correspond to modifications included in the sequence of the primer and do not complement the published sequence for the gene. The bases in which are underlined complement those present in the *M. tuberculosis* and *M. bovis* genes.

According to the protocol adopted by Espinosa et al¹⁹, each DNA sample was subject to two PCRs in separate tubes. In each PCR the forward primer was the same, pncATB-1.2, for *M. tuberculosis* or pncAMB-2 for *M. bovis*.

For each PCR reaction the tube contained 2-5 ml of DNA (approximately 100 ng),

M. tuberculosis e *M. bovis*.

Segundo o protocolo, adaptado do trabalho de Espinosa e colaboradores¹⁹, cada amostra de DNA foi sujeita a dois PCR em tubos separados. Em cada PCR o *primer forward* foi o mesmo, pncATB-1.2, em conjunto com um dos dois *primers reverse*, pncAMT-2 para *M. tuberculosis* ou pncAMB-2 para *M. bovis*.

Cada reacção de PCR continha no tubo de reacção 2-5 ml de DNA (aproximadamente 100 ng), 25 ml da solução FidelityTaq™ PCR Master Mix (Amersham Biosciences, USB, Cleveland, Ohio, USA), 0,8 µM de cada *primer* (pncATB-1.2 e pncAMT-2 para *M. tuberculosis* ou pncATB-1.2 e pncAMB-2 para *M. bovis*), acrescentando-se água destilada, desionizada e esterilizada, de forma a perfazer um volume reaccional total de 50 µl.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf, Alemanha). As condições do PCR incluíam as seguintes etapas: desnaturação a 95°C durante 12 minutos, seguida de 30 ciclos incluindo uma desnaturação a 94°C durante 1 minuto, uma fase de emparelhamento (*annealing*) a 67°C durante 1 minuto e uma de extensão a 72°C durante 1 minuto. A extensão final foi de 72°C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% e visualizados por fluorescência utilizando brometo de etídeo. Um único produto de 185 pares de bases (bp) deve ser visualizado em cada uma das reacções para *M. tuberculosis* ou *M. bovis*.

25 µl of FidelityTaq™ solution PCR Master Mix (Amersham Biosciences, USB, Cleveland, Ohio, USA), 0.8 µM of *primers* (pncATB-1.2 e pncAMT-2 for *M. tuberculosis* or pncATB-1.2 and pncAMB-2 for *M. bovis*), adding distilled, de-ionised and sterilised water, to make up a total reaction volume of 50 µl.

PCR reactions were carried out in a Mastercycler® Personal (Eppendorf, Germany). Conditions of the PCR included the following stages: denaturation to 95°C for 12 minutes followed by 30 cycles including a denaturation to 94°C for 1 minute, an annealing stage to 67°C for 1 minute and one extended to 72°C for 1 minute. The final extension was at 72°C for 5 minutes. PCR products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gel and visualized by fluorescent dye using ethidium bromide. A specific product of 185 base pairs should be seen in each of the reactions for *M. tuberculosis* or *M. bovis*.

PCR sequencing method for analysis of the polymorphism at position 169 of the *pncA*

The *pncA* gene, of 558 pb and regulating sequence were amplified using the primers pncA-1 (5'- gctggtcatgttcgcatcg-3') and pncA-2 (5'- caggagctgcaaactcg-3') described by Sreevatsan et al¹⁸.

For each PCR reaction the tube contained 2-5 ml of DNA (approximately 100 ng), 25 µl of FidelityTaq™ solution PCR Master Mix (Amersham Biosciences, USB, Cleveland, Ohio, USA), 0.8 µM of primers (pncA-1 e pncA-2) for *M. tuberculosis*), adding distilled, de-ionised and sterilised water, to make up a total reaction volume of 50 µl.

PCR reactions were carried out in a

Método PCR-sequenciação para a análise do polimorfismo na posição 169 do gene *pncA*

O gene *pncA*, de 558 pb, e sequência reguladora, foram amplificados utilizando os primers *pncA*-1 (5'- gctggtcatgttcgcatcg-3') e *pncA*-2 (5'- caggagctgcaaaccaactcg-3') descritos por Sreevatsan e colaboradores¹⁸. Cada reacção PCR continha no tubo de reacção 2-5 µl de DNA (aproximadamente 100 ng), 25 µl da solução Fidelity™ PCR Master Mix (Amersham Biosciences, USB, Cleveland, Ohio, USA), 0,8 µM de cada primer (*pncA*-1 e *pncA*-2), acrescentando-se água destilada, desionizada e esterilizada, de forma a perfazer um volume reaccional total de 50 µl.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf, Alemanha). As condições do PCR incluíam as seguintes etapas: desnaturação a 94°C durante 60 segundos, seguida de 30 ciclos incluindo uma desnaturação a 94°C durante 21 segundos, uma fase de emparelhamento (*annealing*) a 60°C durante 21 segundos e uma de extensão a 72°C durante 15 segundos, terminando por um ciclo de 5 minutos a 72°C. Os produtos PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% e visualizados por fluorescência utilizando brometo de etídeo. Um único produto de 673 pb deve ser visualizado em cada uma das reacções para *M. tuberculosis* ou *M. bovis*. Os produtos PCR amplificados foram purificados com o *Jet Quick-PCR Purification Kit* (Genomed) de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente, visualizados sob luz UV por electroforese em gel de agarose (1%) após corar com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo.

Mastercycler® Personal (Eppendorf, Germany). Conditions of the PCR included the following stages: denaturation to 94°C for 60 seconds followed by 30 cycles including a denaturation to 94°C for 21 seconds, an annealing stage to 60°C for 21 seconds and one extended to 72°C for 15 seconds, finishing with an extension to 72°C for 5 minutes. PCR products were analysed by electrophoresis in agarose gel at 2% and visualized by fluorescent dye using ethidium bromide. A specific product of 673 base pairs should be seen in each of the reactions for *M. tuberculosis* or *M. bovis*.

The amplified PCR products were purified with a "Jet Quick-PCR Purification Kit" (Genomed) in accordance with the manufacturer's instructions and later visualized under UV light by electrophoresis in 1% agarose gel after dyeing with 0.5 mg/ml of ethidium bromide. All the sequences were determined in an automatic capillary sequencer CEQ 2000-XL (Beckman Coulter, USA, at ICAT - Fragment Analysis and Sequencing Laboratory of Lisbon University Science Faculty) using the dideoxy termination method marked with specific fluorochromes (DTCS Dye Terminator Cycle Sequencer Start Kit, Beckman Coulter). Two sequencing reactions were carried out using both primers in the PCR amplification.

GenoType® MTBC for the analysis of polymorphism in the *gyrB* gene

The GenoType® MTBC kit (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) is based on the principle of reverse hybridization for the product containing frag-

Todas as sequências foram determinadas num sequenciador automático de capilares CEQ 2000-XL (Beckman Coulter, USA, no ICAT- Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa) utilizando o método de terminação dideoxi marcados com fluocromos específicos (DTCS, *Dye Terminator Cycle sequencer start kit*, Beckman Coulter). Efectuaram-se duas reacções de sequenciação com ambos os *primers* utilizados na amplificação PCR.

GenoType® MTBC para a análise do polimorfismo do gene *gyrB*

O *kit* GenoType® MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), é baseado na tecnologia DNA.Strip® e no princípio da hibridação reversa, a partir do produto contendo fragmentos do gene *gyrB*, do gene da 23S rRNA e da região RD1, amplificado por um PCR multiplex (PCR que inclui vários pares de *primers*). A análise do polimorfismo do gene *gyrB* permite diferenciar entre todas as espécies do MTBC (*M. africanum* subtipo I, *M. microti*, *M. bovis ssp. bovis* e *M. bovis ssp. caprae*), à excepção das *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtipo II e *M. canetti*, uma vez que estas subespécies têm uma sequência do gene *gyrB* idêntica. O *M. bovis* BCG é diferenciado pela identificação da deleção na região RD1²⁴. Os fragmentos amplificados do gene da 23S rRNA incluem sequências que cobrem bactérias Gram-positivas ricas em G+C (controlo da amplificação) e sequências específicas para todos os membros do MTBC.

A técnica foi realizada segundo as recomendações do fabricante. O procedi-

ments of the *gyrB* gene, of the gene of the 23S rRNA and in the RD1 region, amplified by a PCR multiplex (a PCR including various pairs of primers). Analysis of the polymorphism of gene *gyrB* permits differentiation between all types of MTBC (*M. africanum* subtype I, *M. microti*, *M. bovis ssp bovis* and *M. bovis ssp caprae*), with the exception of *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtype II and *M. caneti*, as these subtypes have an identical sequence of the *gyrB* gene. The *M. bovis* BCG is distinguished by identification of deletion in the RDI region²⁴. The amplified fragments of the gene of 23S rRNA include sequences covering gram-positive bacteria rich in G+C (amplification control) and specific sequences to all members of the MTBC.

The technique was carried out according to manufacturer's recommendations. The procedure is divided into two stages from the isolation of bacterial DNA, a multiple amplification with biotinylated primers and reverse hybridization.

Each PCR reaction, undertaken from a sample of DNA, in a reaction tube with 5 µl of DNA (20-100 ng of DNA), 35 µl of the solution supplied by the kit, containing primers and nucleotides (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), 2.5 mM of MgCl₂ (Fermentas MBI, Portugal) and 1.5 U of Taq polymerase (Fermentas MBI, Portugal) with a final volume of 50 µl. PCR reactions were carried out in a Mastercycler® Personal (Eppendorf, Germany). Amplification conditions consisted of denaturation for 15 minutes to 95°C, followed by 10 cycles including a denaturation to 95°C for 25 seconds, an annealing stage at 53°C for 40 seconds and an extension of 40 seconds

mento é dividido em dois passos a partir do isolamento do DNA bacteriano, uma amplificação múltipla com *primers* biotinilados e uma hibridação reversa.

Cada reacção PCR, realizada a partir da amostra de DNA, continha no tubo de reacção 5 µl de DNA (20-100 ng de DNA), 35 µl da solução fornecida pelo *kit* contendo os *primers* e nucleótidos (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), 2.5 mM de MgCl₂ (Fermentas MBI, Portugal) e 1.5 U de *Taq polymerase* (Fermentas MBI, Portugal) num volume final de 50 µl. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf, Alemanha). O protocolo de amplificação consistiu em 15 minutos de desnaturação a 95°C, seguida de 10 ciclos incluindo uma desnaturação de 30 segundos a 95°C, uma fase de emparelhamento (*annealing*) de 2 minutos a 58°C, uma segunda série de 20 ciclos com uma desnaturação a 95°C durante 25 segundos, uma fase de emparelhamento (*annealing*) a 53°C durante 40 segundos e uma de extensão de 40 segundos a 70°C. A extensão final foi efectuada a 70°C durante 8 minutos. Foram analisados 5 µl de cada produto de PCR por electroforese em gel de agarose a 2% e visualizados por fluorescência utilizando brometo de etídeo.

A hibridação incluiu as seguintes etapas: desnaturação química dos produtos da amplificação, hibridação dos amplicões biotinilados em cadeia simples com as sondas imobilizadas sobre a tira, lavagens rigorosas, adição do conjugado estreptavidinafosfatase alcalina e reacção cromogénica. Resumindo, foram colocados 20 µl de solução de desnaturação fornecida pelo

at 70°C. The final extension was carried out at 70°C for 8 minutes. 5ml of each PCR product was analysed by electrophoresis in agarose gel at 2% and visualized by fluorescent dye using ethidium bromide.

Hybridization included the following stages: chemical denaturation of products of amplification, hybridization of biotinylated increases in simple chain with soundings turned off above the strip, rigorous rinsing, addition of a streptavidin-alkaline phosphate mixture, and chromogenic reaction. 20ml of denaturation solution supplied with the kit and 20ml of the amplified sample were placed at the bottom of each well on the sample dish, which was incubated for 5 minutes at room temperature. 1 ml of the hybridization plug, pre-heated to 45°C, in each well. A strip of membrane was placed in each well of the dish and incubated at 45°C with agitation. Two rinsing stages followed. For colourimetric detection, 1 ml of diluted streptavidin-alkaline phosphate mixture was added to each strip and incubated with agitation for 30 minutes. Three more rinsings were given. 1ml of diluted substrate was added to each strip, which was then incubated without agitation and kept away from light for 20 minutes. The reaction was stopped by rinsing with distilled water. The strips were removed and placed on absorbent paper. Interpreting of results was straightforward using the chart supplied with the kit

Results

Table I shows results of the analysis made for Spoligotyping with the GenoType® MTBC kit and by the allele-specific and

kit e 20 µl da amostra amplificada numa extremidade de cada poço da placa. Incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 ml do tampão de hibridação pré-aquecido a 45 °C em cada poço. Colocou-se uma tira de membrana em cada poço da placa e incubou-se 30 minutos a 45°C no banho-maria com agitação. Seguiram-se duas etapas de lavagem. Para detecção colorimétrica, adicionou-se a cada tira 1 ml de conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina diluído e incubou-se com agitação durante 30 minutos. Seguiram-se mais três lavagens. Adicionou-se a cada tira 1 ml de substrato diluído e incubou-se sem agitação ao abrigo da luz cerca de 20 minutos. Parou-se a reacção lavando com água destilada. Retiraram-se as tiras e colocaram-se sobre papel absorvente. Os sinais obtidos são facilmente interpretados com a ajuda de uma matriz fornecida pelo *kit*.

Resultados

No Quadro I, são apresentados os resultados da análise por *Spoligotyping*, pelo *kit* GenoType® MTBC e pelos métodos PCR alelo-específico e PCR-sequenciação para a análise do polimorfismo do gene *pncA*, além dos resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos de 1ª linha. Os *Spoligotypes* partilhados por mais de uma estirpe foram designados ST (*shared types*), como previamente^{21,22}. O estudo foi realizado sobre onze estirpes com ST do tipo *M. bovis* pela técnica do *Spoligotyping*, devido à ausência característica dos espaçadores 39 a 43. Para além da ausência dos espaçadores 39 a 43, os ST não identificados contam igualmente com a ausência do espaçador 38 (Quadro I). Dos 11 isolados

sequenciados PCR métodos para análise de polimorfismo do gene *pncA*, bem como resultados de testes de sensibilidade para primeira linha antibióticos.

Spoligotypes partilhados por mais de uma estirpe foram designados STs (tipos partilhados) como em estudos anteriores^{21,22}. O estudo foi realizado em 11 estirpes com STs de *M. bovis* através da técnica de *Spoligotyping*, devido à característica ausência de espaçadores 39-43. Além da ausência destes espaçadores, os STs não identificados também têm ausência do espaçador 38 (Tabela I). Dos 11 amostras, um isolado mostrou existir com o padrão de *Spoligotyping* classificável com base em dados internacionais²² com o ST402, e 11 isolados (divididos em dois STs), cujos padrões não foram encontrados nos dados analisados (Tabela II)^{22,23}

No estudo de susceptibilidade fenotípica a primeira linha antibióticos, um caso de monoresistência à PZA (estirpe 281) foi detectado e um caso de multi-resistência, com resistência a cinco antibióticos, incluindo PZA (estirpe 36). Não foi realizado estudo de resistência a antibióticos em três das 11 estirpes e não foi realizado estudo de resistência à PZA em cinco das 11 estirpes.

O estudo de polimorfismo na posição 169 do gene *pncA* foi realizado por dois métodos: o método PCR alelo-específico e o método PCR sequenciado. Nenhuma das técnicas permitiu a análise de todos os isolados, pois houve amostras que não mostraram amplificação por uma das PCRs.

Os 11 isolados clínicos foram submetidos ao método PCR alelo-específico com primers específicos para o gene *pncA* de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. A visualização no gel de agarose é mostrada no Gráfico 1. No

Quadro I - Padrões de *Spoligotyping* das estirpes analisadas

<i>Spoligotypes</i>	International <i>Spoligotype</i> database ¹	<i>M. bovis</i> <i>Spoligotype</i> database ²	N.º de isolados
	ST402	NI	1
	NI ³	NI	2
	NI	NI	8
	ST482	SB0120	Controlo BCG ⁵
	ST451	NA ⁴	Controlo H37Rv ⁵

¹ ST – *Shared type* (tipos de *Spoligotype* partilhados) identificado na *International Spoligotype database* http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm
² SB – Tipos de *Spoligotypes* identificados na *M. bovis Spoligotype database*: <http://www.mbovis.org/spoligodatabase/patternnotpresent.htm>
³ NI – ST não identificados na base de dados internacional
⁴ NA – Não aplicável
⁵ Controlos positivos da técnica de *Spoligotyping*: *M. tuberculosis* H 37Rv e *M. bovis* BCG

Table I – *Spoligotyping* patterns of strains analysed

<i>Spoligotypes</i>	International <i>Spoligotype</i> database ¹	<i>M. bovis</i> <i>Spoligotype</i> database ²	Number of isolates
	ST402	NI	1
	NI ³	NI	2
	NI	NI	8
	ST482	SB0120	BCG Control ⁵
	ST451	NA ⁴	H37Rv Control ⁵

¹ ST – “Shared Type” (types of shared *Spoligotype*) identified in the *International Spoligotype database* http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm
² SB – Types of *Spoligotypes* identified in the *M. bovis Spoligotype database*: <http://www.mbovis.org/spoligodatabase/patternnotpresent.htm>
³ NI – STs not identified in the international data base
⁴ NA – Not applicable
⁵ Positive controls of *Spoligotyping*: *M. tuberculosis* H 37Rv e *M. bovis* BCG technique

clínicos, verificou-se a existência de 1 isolado com um padrão de *Spoligotyping* classificável na base de dados internacional²² com o ST402 e 10 isolados (divididos em dois ST) cujos padrões não se encontram nas bases de dados analisadas (Quadro II)^{22,23}. Do estudo da susceptibilidade fenotípica aos antibióticos de 1.ª linha, foi detectado

majority of samples amplification of the *pncA* gene was obtained. Isolates with internal code 301 and 307 were the only ones not to show amplification of the *pncA* gene. Isolates analysed by this method were classified as belonging to the *M. tuberculosis* type (Graph 1, Table II). These results were confirmed using the sequenced PCR method, by which it was shown

Quadro II – Características genéticas e resistência fenotípica aos antibióticos da primeira linha das estirpes analisadas

Nº Estirpe ¹	Spoligotypes	GenoType® MTBC ²	Mutação pncA ³	Susceptibilidade aos antibióticos ⁴				
				INH	RIF	STM	EMB	PZA
301		T	T	S	S	S	S	S
25		T	T	R	R	S	S	ND
281		T	T	S	S	S	S	R
307		T	T	S	S	R	S	S
319		T	T	R	R	R	R	S
291		T	T	ND	ND	ND	ND	ND
182		T	T	R	R	S	S	ND
56		T	T	ND	ND	ND	ND	ND
267		T	T	ND	ND	ND	ND	ND
36		T	T	R	R	R	R	R
61		T	T	S	S	S	S	S
BCG ⁵		BCG	B	S	S	S	S	S
H37Rv ⁵		T	T	S	S	S	S	S

¹ Nº estirpe = Número da estirpe, código interno.

² GenoType® MTBC para a análise do polimorfismo do gene *gyrB*. Permite diferenciar entre todas as espécies do MTBC (*M. africanum* subtipo I, *M. microti*, *M. bovis* ssp. *bovis* e *M. bovis* ssp. *caprae*) à exceção *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtipo II e *M. canettii*, aqui designadas por T para *M. tuberculosis*.

³ Análise do polimorfismo do gene *pncA* (correspondendo a modificação de C para G na posição nucleotido 169 do gene), pelo método PCR alelo-específico ou pelo método PCR-sequenciação, permitindo a distinção entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

⁴ Susceptibilidade antibiótica efectuada segundo o plano laboratorial do hospital.

⁵ Controlos *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG

⁶ Abreviaturas: T, *M. tuberculosis*; B, *M. bovis*; R, resistente; S, sensível; INH, isoniazida; RIF, rifampicina; STM, estreptomicina; EMB, etambutol; PZA, pirazinamida; ND, não documentado.

um caso de monorresistência à PZA (estirpe 281) e um caso de multirresistência, com resistência aos 5 antibacilares, incluindo a PZA (estirpe 36). Não foi efectuado qualquer estudo de resistência a antibacilares em 3 das 11 estirpes, nem o estudo de resistência a PZA em 5 das 11 estirpes.

O estudo do polimorfismo na posição 169 do gene *pncA* foi efectuado por dois métodos: método PCR alelo-específico e método PCR-sequenciação. Nenhum dos métodos permitiu a análise de todos os isolados, havendo amostras que não apresentaram ampliações por um dos PCR.

Os 11 isolados clínicos foram submetidos pelo método PCR alelo-específico à téc-

that the *pncA* gene of the cytosine base (C), present in the majority of *M. Tuberculosis* isolates, by the guanine base (G), the mutation giving rise to resistance to PZA. The isolate with the internal code 61 was the only one for which there was no amplification of the *pncA* gene by this method.

Date presented in Graph 2 shows results of the analysis of polymorphism in the *gyrB* gene by the GenoType® MTBC method. With this type of genotyping technique it is possible to classify the isolates analysed as being strains of the group *M. tuberculosis*.

Or rather, a distinction is not allowed between *M. tuberculosis*, *M. canettii* and *M.*

Table II – Genetic characteristics and phenotypic resistance to first line antibiotics of strains analysed

Strain number ¹	Spoligotypes	GenoType® MTBC ²	pncA ³ Mutation	Susceptibility to antibiotics ⁴				
				INH	RIF	STM	EMB	PZA
301		T	T	S	S	S	S	S
25		T	T	R	R	S	S	ND
281		T	T	S	S	S	S	R
307		T	T	S	S	R	S	S
319		T	T	R	R	R	R	S
291		T	T	ND	ND	ND	ND	ND
182		T	T	R	R	S	S	ND
56		T	T	ND	ND	ND	ND	ND
267		T	T	ND	ND	ND	ND	ND
36		T	T	R	R	R	R	R
61		T	T	S	S	S	S	S
BCG ⁵		BCG	B	S	S	S	S	S
H37Rv ⁵		T	T	S	S	S	S	S

¹ Strain number, internal code.

² GenoType® MTBC for analysis of polymorphism of gyrB gene. Allows differentiation between all types of MTBC (*M. africanum* subtype I, *M. microti*, *M. bovis* ssp. *bovis* e *M. bovis* ssp. *caprae*) with the exception of *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtype II and *M. canettii*, designated here as T for *M. tuberculosis*.

³ Analysis of polymorphism of *pncA* gene (corresponding to modification C to G in nucleotide position 169 of gene), by allele-specific PCR or sequential PCR, allowing distinction between *M. bovis* and *M. tuberculosis*.

⁴ Antibiotic susceptibility according to hospital laboratory criteria.

⁵ *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* BCG controls

⁶ Abbreviations: T, *M. tuberculosis*; B, *M. bovis*; R, resistant; S, sensitive; INH, isoniazid; RIF, rifampicin; STM, streptomycin; EMB, ethambutol; PZA, pyrazinamide; ND, not documented

nica de PCR, com *primers* específicos do gene *pncA* de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. A visualização em gel de agarose está apresentada na Fig. 1. Na maioria das amostras obteve-se amplificação do gene *pncA*. Os isolados com os códigos internos 301 e 307 foram os únicos para os quais não houve amplificação do gene *pncA*. As amostras analisadas por este método foram classificadas como pertencente à espécie *M. tuberculosis* (Fig. 1, Quadro II). Estes resultados foram confirmados utilizando o método PCR-sequenciação, pelo qual se verificou a não substituição na posição 169 do gene *pncA* da base citosina (C), presente na maioria dos isolados de *M. tuberculosis*, pela base guanina

africanum subtype II if the strains belong to one of these three types. Also, according to the results derived through the GenoType® MTBC kit, the possibility of these isolates belonging to the *M. Bovis* strain cannot be confirmed.

Discussion

New molecular technology has completely changed the laboratory diagnosis of tuberculosis, allowing better and swifter identification of the MTBC family. New techniques in molecular biology have shown that MTBC is more extensive than had previously been thought. It has been proved by various research projects that spoligotyping is one of the

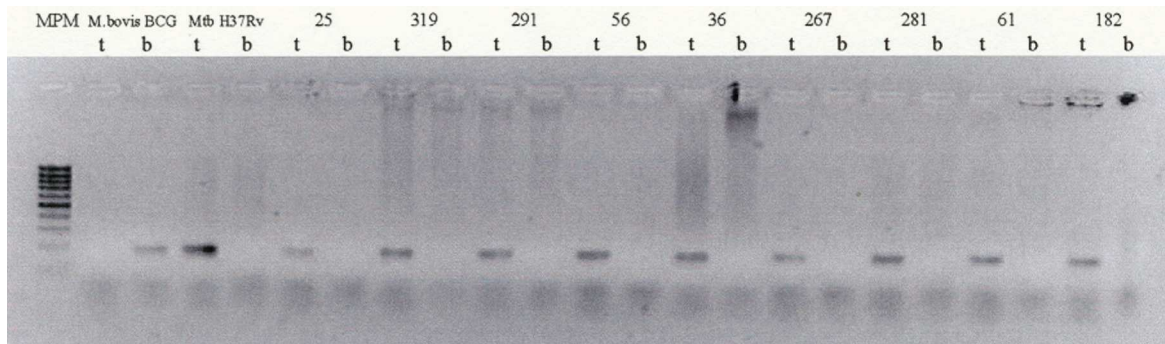


Fig. 1 – Resultados obtidos pelo estudo do polimorfismo alelo específico do gene *pncA*. A análise por electroforese dos produtos de amplificação permitiu verificar para cada amostra a presença de uma banda de 185pb. A sigla **t** designa a utilização do *primer reverse* *pncAMT-2*, que foi desenhado para emparelhar unicamente com a sequência do gene *pncA* do *M. tuberculosis*; e a sigla **b** a utilização do *primer reverse* *pncAMB-2*, que permite amplificação da sequência do gene *pncA* do *M. bovis*. As amostras 1 e 2 são os controlos positivos (*M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG) que confirmam a amplificação do gene *pncA* a partir do *primer pncAMT-2* para a estirpe *M. tuberculosis* e a amplificação do gene *pncA* da estirpe *M. bovis* a partir do *primer pncAMB-2*. Em todas as estirpes clínicas analisadas, a amplificação do gene *pncA* realizou-se com a utilização do *primer pncAMT-2, t*.

Fig. 1 – Results obtained by the allele-specific polymorphism of the *pncA* gene. Analysis by electrophoresis of amplification products shows in each sample the presence of a band of 185 pb. **t** shows the use *pncAMT-2* of primer reverse, aimed to uniquely match with the sequence of gene *pncA* of *M. tuberculosis*. and **b**, its use to allow amplification of the sequence of the genes *pncA* of *M. bovis*. Samples 1 and 2 are the positive controls (*M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG), which confirm the amplification of the *pncA* gene of the *M. bovis* strain from the *pncAMB-2* primer. In all clinical strains analysed, the amplification of the *pncA* gene was achieved by use of primer *pncAMT-2, t*.

(G), mutação que dá origem a resistência à PZA. O isolado com o código interno 61 foi o único para o qual não houve amplificação do gene *pncA* por este método. Os dados apresentados na Fig. 2 correspondem aos resultados da análise do polimorfismo do gene *gyrB* pelo método GenoType® MTBC. Por esta técnica de genotipagem é possível classificar os isolados analisados como sendo estirpes do grupo *M. tuberculosis*. Ou seja, não permitiu a distinção entre *M. tuberculosis*, *M. canettii* e *M. africanum* subtipo II, na eventualidade das estirpes pertencerem a alguma destas três espécies. Também de acordo com os resultados obtidos através do *kit* GenoType® MTBC, não se confirma a

most apt methods in the labelling of types of MTBC, permitting differentiation between the different members of the complex. However, spoligotyping is only one of various genotyping techniques used to distinguish between MTBC members. These methods must not be used separately, but rather in conjunction with biochemical and phenotypic tests among other molecular techniques.

In a recent study using spoligotyping on clinical isolates originating from tuberculosis patients at the Fernando Fonseca Hospital, we obtained isolates of the spoligotype pattern that were characteristic of *M. bovis* (due to absence of spacers 39- 43), representing 3.7% of the total²¹. None of

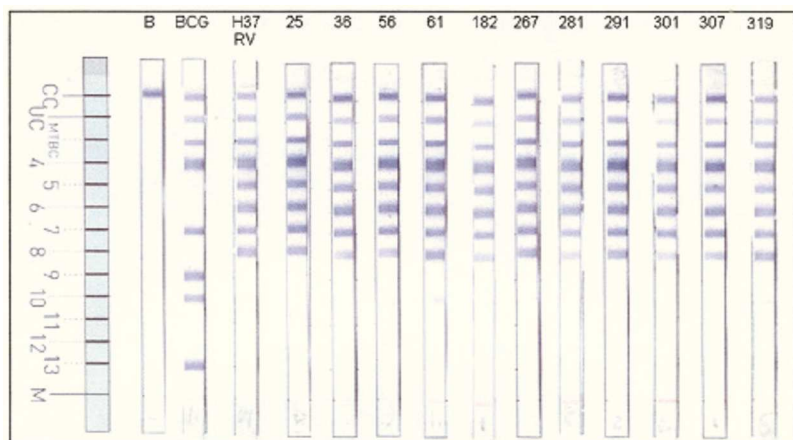


Fig. 2 – Resultados obtidos pelo método *kit* GenoType® MTBC. A posição dos oligonucleótidos e a linha indicadora são apresentados à esquerda. Os genes alvo e específicos presentes nessa linha são: CC, controlo conjugado; UC, controlo de amplificação (23 rRNA); MTBC, gene específico de MTBC (23 rRNA); 4 a 12, gene *gyrB* discriminativo para espécies do MTBC; 13, *M. bovis* BCG (RD1); M, linha marcadora para a orientação correcta da tira. Os padrões de cada tira são: B, controlo negativo; BCG, controlo positivo *M. bovis* BCG; H37Rv, controlo positivo *M. tuberculosis* H37Rv; 25 até 319 (número da estirpe, código interno). As estirpes clínicas analisadas apresentaram o génotipo de *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtipo II ou *M. canettii*.

Fig 2 – Results obtained by the GenoType® MTBC kit. The position of the oligonucleotides and the display line are shown to the left. The target genes and specific items on this line are: CC, joint control, UC, amplification control (23 rRNA); MTBC, specific gene of MTBC (23 rRNA); 4 to 12, discriminating gene *gyrB* for types of MTBC; 12, *M. bovis* BCG (RD1); M, marking line for correct positioning of strip. Patterns for each strip are: B, negative control; BCG, positive control *M. bovis* BCG; H37Rv, positive control *M. tuberculosis* H37Rv; 25 to 319 (strain number, internal code). Clinical stains analysed presented the genotype of *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtype II or *M. canettii*.

As novas técnicas de biologia molecular mostraram que o MTBC é mais vasto do que anteriormente se pensava

possibilidade destes isolados pertencerem à estirpe *M. bovis*.

Discussão

A tecnologia molecular alterou por completo o diagnóstico laboratorial da tuberculose, permitindo uma melhor e mais rápida identificação dos membros do MTBC. As novas técnicas de biologia molecular mostraram que o MTBC é mais vasto do que anteriormente se pensava. Vários grupos de investigação compro-

these Spoligotypes was similar to that of the *M. bovis* BCG supplied with the kit.

The aim of this study was to evaluate 11 strains from isolates of patients in the Fernando Fonseca Hospital, which had spoligotyping patterns suggesting *M. bovis*, and to confirm the nature of these clinical isolates using the GenoType® MTBC kit (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) to analyse polymorphism of gene *gyrB*, and the PCR method to test the polymorphism of the *pncA* gene.

After comparison with databases on the spoligotypes of MTBC and those of *M. bovis*, it was seen that only one clinical isolate was identified from the data as spoligotype ST402. Besides the absence of spacers 39-43, the non-identified STs also shared a lack of spacer 38.

In the study of phenotypic susceptibility to first line antibiotics, a case of mono-resistance to PZA (strain 281) was detected and a case of multi-resistance, with resistance to five antibiotics, including PZA (strain 36). PZA-resistant MTBC isolates are generally associated with multi-resistance. However, mono-resistance to PZA is a characteristic almost exclusive to *M. bovis* and *M. bovis* BCG²⁵. This mono-resistance is due to polymorphism of the *pncA* gene in position 169, where *M. bovis* presents the guanine nucleotide base (G), and other types of the *M. tuberculosis* complex the cytosine base (C).

Thus, there is a substitution of the amino acid histidine (CAC) with aspartic acid (GAC), making these strains inactive to the pyrazinamidase enzyme and consequently resistant to pyrazinamide. However, *M. bovis* strains sensitive to pyrazinamide could exist, as is the case of *M.*

varam que o *Spoligotyping* é uma das tecnologias mais específicas na caracterização das espécies do MTBC, permitindo a diferenciação entre os diferentes membros do complexo. No entanto, o *Spoligotyping* é apenas uma das várias técnicas de genotipagem utilizadas para a diferenciação dos membros do MTBC. Estas técnicas não devem ser utilizadas separadamente, mas sim complementadas com testes fenotípicos, bioquímicos, entre outras técnicas moleculares.

Num estudo recente, em isolados clínicos provenientes de doentes com tuberculose do Hospital Fernando Fonseca, obtivemos pela técnica de *Spoligotyping* isolados com um padrão de *Spoligotype* característicos de *M. bovis* (pela ausência característica dos espaçadores 39 a 43), representando 3,7 % do total.²¹ Nenhum destes *Spoligotypes* foi semelhante ao do *M. bovis* BCG, fornecido como padrão pelo *kit*.

O objectivo deste estudo foi avaliar 11 estirpes, provenientes dos isolados dos doentes do Hospital Fernando Fonseca, com padrões de *Spoligotyping* característico de *M. bovis* e, de forma a confirmar a natureza destes isolados clínicos, recorreremos ao uso do *kit* GenoType® MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), para a análise do polimorfismo do gene *gyrB* e da técnica PCR para a análise do polimorfismo do gene *pncA*.

Em comparação com as bases de dados referentes aos *Spoligotypes* do MTBC, e aos *Spoligotypes* de *M. bovis*, verificou-se que apenas um isolado clínico era identificado nas bases de dados com o *Spoligotype* ST402. Para além da ausência dos espaçadores 39-43, os ST não identificados contam igualmente com ausência do espaçador 38.

bovis subsp caprea in goats.

In the study of polymorphism in position 169 of the *pncA* gene, we found in all clinical isolates the characteristic allele of *M. tuberculosis*, and not of *M. bovis*.

Analysis of polymorphism in the *gyrB* gene is another tool that allows a quick differentiation between the strains of *M. bovis subsp. bovis*, *M. bovis subsp. caprae*, *M. microti*, as well as the subtype 1 of *M. africanum* because specific polymorphisms exist for each of these types of *gyrB* gene. However, the strains *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtype II and *M. canetti* present DNA sequences identical for this gene, ruling out their differentiation by this test. By analysis of polymorphism of the *gyrB* gene using the GenoType® MTBC method, we showed that all the clinical isolates in this study are of the type *M. tuberculosis*, or in other words, it was not possible to make a distinction between *M. tuberculosis*, *M. africanum* II and *M. canetti* in the case of any of the strains belonging to these three types.

Currently, differentiation of MTBC members is made by genotyping of strains. However, genetic variation rules out the individual use of this type of technique. Even if all the characteristics of a type have been confirmed with the exception of a determined genetic characteristic, this does not invalidate the designation of this strain as belonging to this type. The attempt to bracket strains can often cause controversy at the heart of the scientific community.

As an example, strains which support *M. bovis subsp caprae* were originally labelled *M. tuberculosis subsp capare*. These strains were placed in this second group due to the fact

O Spoligotyping é uma das tecnologias mais específicas na caracterização das espécies do MTBC

Do estudo da susceptibilidade fenotípica aos antibióticos de 1ª linha, foi detectado um caso de monorresistência à PZA (estirpe 281) e um caso de multirresistência, com resistência aos 5 antibacilares, incluindo a PZA (estirpe 36). Isolados do MTBC, com resistência à PZA, são geralmente associados à multirresistência. Contudo, a monorresistência à PZA é característica praticamente exclusiva de *M. bovis* e *M. bovis* BCG²⁵. Esta monorresistência é devida ao polimorfismo do gene *pncA* na posição 169, onde *M. bovis* apresenta a base nucleótida guanina (G) e as outras espécies do complexo *M. tuberculosis* a base nucleótida citosina (C). Há, assim, uma substituição do aminoácido histidina (CAC) pelo ácido aspártico (GAC), o que confere a essas estirpes a inativação da enzima pirazinamidase, e, conseqüentemente, a resistência à pirazinamida. Podem, no entanto, existir estirpes de *M. bovis* sensíveis à pirazinamida, como é o caso da espécie *M. bovis* subsp. *caprae* dos caprinos.

Pelo estudo do polimorfismo na posição 169 do gene *pncA* detectámos em todos os isolados clínicos o alelo característico de *M. tuberculosis*, e não o do *M. bovis*.

O estudo do polimorfismo do gene *gyrB* é outra das ferramentas que permite diferenciar rapidamente estirpes de *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. microti*, assim como o subtipo I de *M. africanum*, uma vez que existem polimorfismos específicos para cada uma destas espécies no gene *gyrB*. Contudo, as estirpes de *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtipo II e *M. canetti*, apresentam sequências de DNA idênticas para este gene, não permitindo a sua distinção por esta análise.

Pela análise do polimorfismo do gene *gyrB*,

they were sensitive to PZA. After studies by Niemann et al¹⁷, it was shown that these strains had phenotypic characteristics: negative testing for niacin accumulation, reduction in nitrates and an increase in the presence of TCH, and not showing colour change in a bromocresol medium, among other tests. Genetic characteristics were specific mutations in the locus *oxyR* and *gyrB* gene, missing spacers 39-43 in the spoligotype - all characteristics of *M. bovis*. Therefore, and because of being singularly sensitive to PZA, these strains are now designated as *M. bovis* subsp. *caprae*^{8,9,17}.

Another example is the separate type *M. africanum*, which is nothing more than an attempt to create a group into which it would be possible to introduce types with characteristics falling between *M. bovis* and *M. tuberculosis*. Certain types of *M. africanum* present phenotypic characteristics closer to *M. bovis* and others are more similar to *M. tuberculosis*. This heterogeneity raised the possibility that *M. africanum* represents a continuous evolving state between *M. bovis* and *M. tuberculosis*²⁶. The first outbreak of multi-resistant *M. africanum*²⁷ tuberculosis, before being finally attributed to this type through analysis of Spoligotyping patterns, was initially identified as being caused by *M. bovis* on the basis of phenotypic criteria (dysgonic colonies, negative results for niacin accumulation and nitrates reduction, growth inhibition of (thiophene-2-carboxylic acid hidrazide and resistance to PZA) and then as *M. tuberculosis* by genotype analysis (high number of IS6110 copies, presence of *mtp40*, polymorphism of genes *pncA* and *oxyR*, and analysis of spacers 40-43 by spoligotyping²⁸).

utilizando a metodologia do GenoType® MTBC, demonstrámos que todos os isolados clínicos deste estudo são do tipo *M. tuberculosis*, ou seja, não foi possível obter a distinção entre *M. tuberculosis*, *M. africanum* II e *M. canetti*, na eventualidade de qualquer das estirpes pertencerem a alguma destas três espécies.

Actualmente, a diferenciação dos membros do MTBC passa pela genotipagem das estirpes. Contudo, não é viável a utilização individual deste tipo de técnicas, uma vez que a variabilidade genética não o permite. Caso todas as características de uma espécie tenham sido confirmadas, à excepção de uma determinada característica genética, isso não invalida a designação dessa estirpe como pertencente a essa espécie. A tentativa de agrupamento das estirpes pode muitas das vezes causar controvérsia no seio da comunidade científica. Por exemplo, as estirpes que comportam a espécie *M. bovis* subsp. *caprae* foram primeiramente designadas *M. tuberculosis* subsp. *caprae*. Estas estirpes foram colocadas nesse segundo grupo, devido ao facto de serem sensíveis à PZA. Após estudos efectuados por Niemann e colaboradores¹⁷, verificou-se que estas estirpes tinham características fenotípicas: testes negativos para a acumulação de niacina, redução de nitratos e crescimento na presença de TCH; não apresentam modificação de cor no meio de bromocresol, entre outros estudos; e características genéticas: mutações específicas no locus *oxyR* e no gene *gyrB*, *Spoligotype* com ausência dos espaçadores 39-43; representativas da espécie *M. bovis*. Desta forma, e por serem unicamente sensíveis a PZA, estas estirpes são hoje designadas como *M. bovis* subsp. *caprae*^{8,9,17}.

The high degree of DNA homology (DNA-DNA hybridization of about 85%-100%) and their immunological properties suggest that MTBC members are more a subtype than distinct category. However, they keep their designation for practical public health reasons, as members of the *M. tuberculosis* complex differ between hospitals in their pathogenicity, phenotype, and epidemiology.

Despite having being identified by spoligotyping as *M. bovis*, the strains analysed in this study are not typically representative of the type, but part of the complex picture currently described as *M. bovis*. In this context, we could be looking at spoligotyping patterns of Portuguese origin, or any genetic variant of existing patterns in international databases. Unfortunately, bacteriological data do not exist in Portugal relating to human infection by *M. bovis* of animal origin, as the collaboration of the Veterinary authorities is essential to evaluate transmission and define risk groups.

The current study permitted us to define genotypes where further bacteriological studies should be supported. As we have shown, among these areas is the study of polymorphism of the *pncA* gene due to its useful and immediate implications for the doctor.

Acknowledgements

Our thanks to Hugo L. David, Honorary Professor at the Pasteur Institute in Paris, and consultant in of Micobacteriology at IHMT, for his support and suggestions during this study. We thank also Professor Leonard Amaral, director of Micobacteriology (IHMT) for his interest in this work.

A diferenciação dos membros do MTBC passa pela genotipagem das estirpes

Outro exemplo é a própria espécie *M. africanum*, que não é mais que uma tentativa de criar um grupo no qual seja possível introduzir espécies com características intermédias entre o *M. bovis* e o *M. tuberculosis*. Certas estirpes de *M. africanum* apresentam características fenotípicas mais próximas de *M. bovis* e outras mais semelhantes ao *M. tuberculosis*. Esta heterogeneidade levou a pensar que *M. africanum* representa um contínuo estado evolutivo entre o *M. bovis* e o *M. tuberculosis*²⁶. O primeiro surto de tuberculose multirresistente por *M. africanum*²⁷, antes de ser atribuído finalmente a esta espécie, pela análise dos padrões do *Spoligotyping*, foi inicialmente identificado como sendo devido a *M. bovis*, com base em critérios fenotípicos (colónias disgónicas, resultados negativos para a acumulação da niacina e redução dos nitratos, inibição de crescimento pelo hidrazido do ácido tiofene-2-carboxílico e resistência à PZA), e a seguir como *M. tuberculosis* por análise genotípica (número elevado de cópias do IS6110, presença de *mtp40*, polimorfismo do gene *pncA* e *oxyR* e análise dos espaçadores 40 a 43 por *Spoligotyping*²⁸.

O elevado grau de homologia do DNA (hibridação DNA-DNA de cerca de 85 a 100%) e as suas propriedades imunológicas, sugerem os membros do MTBC, mais como subespécies do que como espécies distintas. No entanto, manteve-se a designação de espécie por razões práticas de saúde pública, visto que os membros do complexo *M. tuberculosis* diferem na variedade de hospedeiros, na sua patogenicidade, fenótipo e epidemiologia.

As estirpes analisadas neste estudo, apesar de terem sido classificadas por *Spoligotyping*

We also record our gratitude to Christophe Sola and Nalin Rastogi (Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, Guadeloupe) for the use of their Spoligotypes database. This study was partially funded by the Calouste Gulbenkian Foundation and the Foundation for Science and Technology.

como *M. bovis*, não são tipicamente representativas da espécie, mas entram na grande complexidade no que é hoje em dia o *M. bovis*. Neste contexto, podemos estar perante padrões de *Spoligotyping* de origem portuguesa, ou qualquer variante genética dos padrões existentes nas bases de dados internacionais. Infelizmente, em Portugal não existem dados bacteriológicos relativos a infeções humanas por *M. bovis* de origem animal, sendo a colaboração com os serviços veterinários um elemento essencial para avaliar a transmissão e definir grupos de risco. O presente trabalho permitiu-nos definir genótipos sobre os quais deverão apoiar-se os estudos bacteriológicos, entre as quais assinalamos desde já o estudo do polimorfismo do gene *pncA* devido à sua implicação útil e imediata para o médico.

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 Guadeloupe, Guadeloupe), 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 a Tecnologia.

Bibliografia/Bibliography

1. Darbon CJ, Grange J.M. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br Vet J* 1993; 149: 405-417.
2. Blazquez J, Espinosa De Los Monteros LE, Samper S; Martin C, Guerrero A, Cobo J, Van Embden JDA, Baquero F, Gomez-Mampaso E Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1390-1393.
3. Riviero A, Márquez M, Santos J, Pinedo A, Sánchez 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: 159-161.
4. Fanning EA. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, p. 351-364. In P.D.O. Davies (ed.), *Clinical tuberculosis*. Chapman & Hall Medical, London, England, 1994.
5. Gibson AL, Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A, Inwald J, Drobniewski FA. Molecular epidemiology of disease to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 431-434.
6. Dalovisio JR, Setter M, Mikota-Wells S. *Rhinoceros rhinorrhea*: cause of an outbreak of infection due to airborne *Mycobacterium bovis* in zookeepers. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 598-600.
7. Kubica T, Rüsche-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3070-3077.
8. Sales MPU, Taylor GM, Hughes S, Yates M, Hewinson G, Young DB, Shaw RJ. Genetic diversity among *Mycobacterium bovis* isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4558-4562.
9. Gutiérrez M, Samper S, Jiménez MS, Van Embden JDA, Marín JF, Martín C. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3328-3330.
10. Aranz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzalez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JDA, Cousins D.

Em Portugal não existem dados bacteriológicos relativos a infeções humanas por *M. bovis* de origem animal

- 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.
11. 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.
 12. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249(1): 1-26.
 13. Richter E, Weizenegger M, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2672-2675.
 14. Niemann S, Harmsen D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3231-3234.
 15. David H, Brum L, Prieto E. Manual de micobacteriologia em saúde pública: princípios e métodos. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa. 1994.
 16. Collins CH, Yates MD, Grange JM. A study of bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from humans in South-East England, 1977-1979. *Tubercle* 1981; 62: 117-121.
 17. Niemann S, Harmsen D, Rüscher-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: 152-157.
 18. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth B.N, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrobiol Agents Chemother* 1997; 41: 636-640.
 19. Espinosa De Los Monteros LE, Galan C, Gutierrez M, Samper S, Garcia-Martin JF, Martin C, Dominguez L, De Rafael L, Baquero F, Gomez-Mampaso E, Blazquez J. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* intraspecific *M. bovis pncA* polymorphism. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 239-242.
 20. Scorpio A, Collins D, Whipple D, Cave D, Bates J, Zhang Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 106-110.
 21. 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 Pneumologia* 2004; X (3): 195-204.
 22. http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm
 23. <http://www.mbovis.org/spoligodatabase/patternnotpresent.htm>
 24. Talbot EA, William DL, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 566-569.
 25. Salfinger M, Reller LB, Kafader FM. Abstr. 90th Annu Meet Am Soc Microbiol 1990; 12: 38.
 26. David HL, Jahan TM, Jumin A, Grandry J, Lehman EH. Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *Int. J. Systematic Bacteriol* 1978; 467-472.
 27. 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.
 28. Gutierrez MC, Galan JC, Blazquez J, Bouvet E, Vincent V. Molecular markers demonstrate that the first described multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 971-5.