



Revista Portuguesa de Pneumologia

ISSN: 0873-2159

sppneumologia@mail.telepac.pt

Sociedade Portuguesa de Pneumologia  
Portugal

Portugal, Isabel; Barreiro, Luís; Vultos, Tiago; Macedo, Rita; Furtado, Cristina; Fonseca Antunes, António; Brum, Laura

Epidemiologia molecular de Mycobacterium tuberculosis em Lisboa

Revista Portuguesa de Pneumologia, vol. XIV, núm. 2, marzo-abril, 2008, pp. 239-259

Sociedade Portuguesa de Pneumologia  
Lisboa, Portugal

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169718426006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



CMYK



## Artigo Original Original Article

Isabel Portugal<sup>1</sup>  
Luís Barreiro<sup>2</sup>  
Tiago Vultos<sup>2</sup>  
Rita Macedo<sup>3</sup>  
Cristina Furtado<sup>4</sup>  
António Fonseca Antunes<sup>5</sup>  
Laura Brum<sup>6</sup>

### Epidemiologia molecular de *Mycobacterium tuberculosis* em Lisboa

### *Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Lisbon*

Recebido para publicação/received for publication: 07.10.08  
Aceite para publicação/accepted for publication: 07.12.17

#### Resumo

Foi realizado um estudo de epidemiologia molecular a estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas em hospitais de Lisboa. Analisaram-se geneticamente os isolados de *Mycobacterium tuberculosis* com o método *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) utilizando a sequência de inserção IS6110 como sonda, com o objectivo de detectar as estirpes da família Lisboa e determinar a diversidade genética das estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas em Lisboa, identificando os mais importantes factores de risco de transmissão da tuberculose.

#### Abstract

We conducted a molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Lisbon hospitals. We used restriction fragment length polymorphism (RFLP) to detect Lisbon family strains and to determine the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Lisbon, through identification of the most important risk factors of tuberculosis transmission analysis, with the insertion sequence IS6110 as a probe to fingerprint isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. 64.8% of the 290 *Mycobacterium tubercu-*

<sup>1</sup> Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Investigadora Visitante de Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Centro de Patógenos Moleculares, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Portugal. Unidade de Micobactérias, Centro de Bacteriologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal / Assistant Professor, Molecular Pathogenesis Centre, University of Lisbon School of Pharmacy. Guest Researcher, Micobacteria Unit, Bacteriology Centre, Dr Ricardo Jorge National Institute of Health, Lisbon, Portugal

<sup>2</sup> Licenciado em Engenharia Biotecnológica, Unidade de Micobactérias, Centro de Bacteriologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal / BSc, Biotechnological Engineering, Micobacteria Unit, Bacteriology Centre, Dr Ricardo Jorge National Institute of Health, Lisbon, Portugal

<sup>3</sup> Licenciada em Química, Ramo de Bioquímica. Aluna de Mestrado em Microbiologia Clínica. Direcção-Geral de Saúde, Lisboa, Portugal / BSc, Chemistry (Biochemistry), Clinical Microbiology MSc student

<sup>4</sup> Licenciada em Ciências Farmacêuticas. Aluna de Doutoramento em Epidemiologia da Tuberculose; Unidade de Micobactérias, Centro de Bacteriologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal / BSc, Pharmaceutical Sciences. Tuberculosis Epidemiology PhD student. Micobacteria Unit, Bacteriology Centre, Dr Ricardo Jorge National Institute of Health, Lisbon, Portugal

<sup>5</sup> Direcção-Geral de Saúde, Lisboa, Portugal / Directorate-General for Health

<sup>6</sup> Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Assessora de Bacteriologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal. Unidade de Micobactérias, Centro de Bacteriologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal / Guest Assistant Professor, University of Lisbon School of Medical Sciences. Bacteriology Assistant, Micobacteria Unit, Bacteriology Centre, Dr. Ricardo Jorge National Institute of Health, Lisbon, Portugal



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

Foram analisados 290 isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, dos quais 64,8% se encontraram agrupados em *clusters*; mesmo excluindo as estirpes que apresentaram mais de 5 cópias de IS6110, a percentagem de agrupamento foi de 60,7%. A multirresistência foi observada em 4,1% das estirpes e encontraram-se todas em *clusters*. Quarenta e cinco isolados (18,2%) pertenciam à família Lisboa. Considerando a percentagem relativamente alta de estirpes em *cluster* detectada neste estudo, cremos que a transmissão activa continua a ser uma realidade em Lisboa. Para além disso, as estirpes dos *clusters* Lisboa representam as estirpes predominantes que circulam em Lisboa, continuando muito relacionadas com a resistência aos antibacilares, embora correspondam a uma percentagem inferior à verificada em estudos anteriores.

Rev Port Pneumol 2007; XIV (2): 239-259

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, multirresistência, epidemiologia molecular.

*tuberculosis* isolates were grouped in clusters. This figure was 60.7% if we excluded strains with five or fewer IS6110 copies. Multidrug-resistance was observed in 4.1% of the strains and they were all in clusters. Forty-five (18.2%) strains were included in the Lisbon family. Considering the relatively high percentage of strains in cluster detected in this study, we believe that active transmission is still taking place in Lisbon. Moreover, clusters of Lisbon strains represent the predominant strains circulating in Lisbon and are still related to drug resistance although presenting a lower percentage than that observed in previous studies.

Rev Port Pneumol 2007; XIV (2): 239-259

**Key-words:** *Mycobacterium tuberculosis*, multidrug-resistance, molecular epidemiology.



**Portugal  
permanece o país  
com a taxa mais  
elevada de casos  
notificados devido  
ao *Mycobacterium  
tuberculosis***

**Introdução**

Em 2003, a Direcção-Geral de Saúde relatou uma incidência de tuberculose (TB) de 34,4 casos por 100 000 habitantes, sendo 1,8% de casos de tuberculose multirresistente aos antibacilares (TB-MR)<sup>1</sup>. Apesar do declínio significativo da incidência de TB nas últimas décadas, Portugal permanece o país com a taxa mais elevada de casos notificados devido ao *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) nos países do Centro e Oeste da União Europeia (UE), correspondendo a uma incidência de aproximadamente três vezes e meia a média de UE.

**Introduction**

In 2003, the Directorate-General for Health recorded a TB incidence of 34.4 cases per 100,000 inhabitants, with 1.8% cases of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)<sup>1</sup>. Despite a significant decline in TB incidence in recent decades, Portugal is the country with the highest rate of notified cases caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) among countries in the centre and west of the European Union (EU); around three and half times the EU average. Lisbon is the dis-



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

Lisboa apresenta-se o distrito com a incidência mais elevada – 58 casos por 100 000 habitantes<sup>1</sup>. Embora actualmente as estirpes isoladas nos hospitais e nos laboratórios de saúde pública sejam notificadas às autoridades, o verdadeiro valor do problema é desconhecido.

A análise do polimorfismo do ADN baseada na sequência de inserção IS6110 (RFLP-IS6110)<sup>2</sup> tornou-se uma ferramenta indispensável a nível mundial na caracterização genética (tipagem) e comparação de isolados de *M. tuberculosis* em estudos epidemiológicos<sup>3-6</sup>. Não obstante, a tipagem do ADN de isolados clínicos de *M. tuberculosis* não está incluída no programa nacional, e consequentemente poucos estudos de epidemiologia molecular têm sido realizados no nosso país. Em 1998, o nosso grupo identificou por RFLP-IS6110 um grupo particular de estirpes de TB-MR (*cluster* Lisboa) que incluiu 76% das estirpes analisadas<sup>7</sup>. Estas estirpes, detectadas principalmente na região de Lisboa, estavam, no entanto, disseminadas por todo o país. Quando comparámos os perfis das estirpes do *cluster* Lisboa com uma colecção de 6000 *fingerprints* (impressões digitais) IS6110 de estirpes de *M. tuberculosis*, da base de dados internacional estabelecida no Instituto Nacional de Saúde Pública e Protecção Ambiental (RIVM), na Holanda, não encontramos nenhum perfil com similaridade maior do que 85%. Estas estirpes tinham sido isoladas principalmente em doentes HIV-positivos, e a transmissão foi demonstrada, não apenas entre estes doentes, mas também em indivíduos imunocompetentes. Os objectivos deste estudo passam pela avaliação da continuação da prevalência das estirpes do *cluster* Lisboa previamente descrito, pela determinação da diversidade genética das estirpes de *M. tuberculosis* que circulam em Lisboa e pela

strict with the highest incidence – 58 cases per 100 000 inhabitants<sup>1</sup>. Although strains isolated in hospitals and in public health laboratories are notified to the authorities, the true level of the problem remains undefined.

The analysis of DNA polymorphism based on the insertion sequence IS6110 (RFLP-IS6110)<sup>2</sup> is now an indispensable global tool in genetic characterisation (typing) and comparison of *M. tuberculosis* isolates in epidemiological studies<sup>3-6</sup>. However, DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* isolates is not included in the national programme, meaning few studies of molecular epidemiology have been undertaken in Portugal. In 1998, our group used RFLP-IS6110 to identify a particular group of MDR-TB strains (Lisbon cluster), that included 76% of strains analysed<sup>7</sup>. While these strains were primarily detected in the Lisbon region, they were, however, disseminated nationwide. When the profiles of Lisbon cluster strains were compared with a collection of 6,600 fingerprints IS6110 of *M. tuberculosis* strains, based on international data established by the National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM) in the Netherlands, we did not find any profile with similarity greater than 85%. These strains have been mainly isolated in HIV-positive patients and transmission was demonstrated not only in these patients but also in immunocompetent individuals.

The aims of this study were to evaluate the continued prevalence of the Lisbon strain clusters described above though determining the genetic diversity of *M. tuberculosis* strains circulating in Lisbon and by evalua-

**A análise do polimorfismo do ADN baseada na sequência de inserção IS6110 tornou-se uma ferramenta indispensável a nível mundial na caracterização genética (tipagem) e comparação de isolados de *M. tuberculosis* em estudos epidemiológicos**



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

avaliação da proporção da transmissão recente da doença entre os doentes. Para além disso, quisemos identificar os factores de risco mais importantes que possam estar a contribuir para a transmissão recente de TB. Neste estudo, foram caracterizados a nível molecular usando o RFLP-IS6110, estirpes clínicas de *M. tuberculosis* isoladas predominantemente na região de Lisboa.

## Materiais e métodos

### População

A população do estudo incluiu 290 estirpes de *M. tuberculosis* escolhidas aleatoriamente, isoladas de doentes residentes na área de Lisboa entre os anos de 2001 (segundo semestre) e 2002. Os isolados são provenientes de várias instituições hospitalares de Lisboa. 239 estirpes eram susceptíveis a todos os antibacteriais de 1.<sup>a</sup> linha usados no tratamento; 39 apresentavam qualquer tipo de resistência, excepto multirresistência; e 12 eram multirresistentes. Foram analisados alguns dados clínicos e demográficos disponíveis nos registos médicos ou do laboratório, incluindo sexo, idade, área de residência, país de origem, tratamento antibacterial anterior, diagnóstico clínico e serologia para VIH.

### Estirpes de *Mycobacterium*

Um total de 290 estirpes de *M. tuberculosis* isoladas num período de 18 meses, em diversas unidades hospitalares de Lisboa, foram enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, para efeito de testes de susceptibilidade aos antibacteriais e/ou tipagem molecular. As estirpes estudadas são provenientes dos laboratórios de microbiologia de 23 hospitais ou laboratórios de saúde ou, então, foram isoladas neste laboratório. Foi apenas

ting the amount of recent transmission of disease between patients. Additionally, we wanted to identify the most important risk factors that could contribute to recent transmission of TB. In this study, clinical strains of *M. tuberculosis* isolated mainly in the Lisbon region were characterised at molecular level using RFLP-IS6110.

## Methods

### Population

The population of the study included 290 strains of *M. tuberculosis*, chosen randomly, isolated in patients living in the Lisbon area between the second half of 2001 and 2002. The isolates came from various hospital Lisbon hospitals. Some 239 strains were susceptible to all first-line antibiotics used in treatment, 39 presented some type of resistance, excluding multidrug-resistance, and 12 were multidrug-resistant.

We analysed some clinical and demographic data available in medical or laboratory records, including gender, age, area of residence, country of origin, previous antibiotic treatment, clinical diagnosis and HIV serology.

### *Mycobacterium* strains

A total 290 *M. tuberculosis* strains isolated over a period of 18 months, in various Lisbon hospitals, were sent to the Dr Ricardo Jorge National Institute of Health for testing for antibiotic susceptibility and/or molecular typing. The strains studied came from laboratories of 23 hospitals or health laboratories, or were isolated in this laboratory. Only one isolate per patient was considered. All strains were identified as *M. tu-*



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

considerado um isolado por doente. Todas as estirpes foram identificadas como *M. tuberculosis* usando testes bioquímicos convencionais, tal como os recomendados por David *et al.* (1989), ou usando o método Accuprobe (Gene-Probe INC., San Diego, CA).

Todos os isolados foram testados em relação aos seus padrões de susceptibilidade às drogas de 1.<sup>a</sup> linha – isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomicina (SM), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA) – usando os sistemas BACTEC 460 TB SIRE e BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Microbiology Systems, Cockeysville, Md), de acordo com as instruções do fabricante.

**Tipagem por RFLP-IS6110**

A análise por RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi efectuada de acordo com métodos padronizados, usando uma sonda de 245 pb e marcador de peso molecular interno<sup>2</sup>.

Os diferentes perfis de IS6110 foram analisados usando o programa informático Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), tendo em conta o tamanho dos fragmentos e o número de cópias de IS6110 de cada estirpe, tal como já foi descrito<sup>9</sup>. Os coeficientes de similaridade foram calculados usando o coeficiente de Dice e a análise dos *clusters* foi feita usando o algoritmo matemático UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*). Foi definido um *cluster* sempre que isolados do complexo *M. tuberculosis* de diferentes doentes apresentaram o mesmo perfil de RFLP.

Determinou-se a taxa de diversidade genética dividindo o número de diferentes perfis de RFLP pelo número total de estirpes tipadas. O grau de transmissão recente foi cal-

*berculosis* using conventional biochemical tests, such as those recommended by David *et al.* (1989), or used in the AccuProbe method (Gene-Probe INC., San Diego, CA).

All isolates were tested in relation to their susceptibility patterns to first-line drugs – isoniazid (INH), rifampicin (RIF), streptomycin (SM), ethambutol (EMB) and pyrazinamide (PZA) using the systems BACTEC 460 TB SIRE and BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Microbiology Systems, Cockeysville, Md) in accordance with the manufacturers' instructions.

**RFLP-IS6110 typing**

Analysis by RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) was carried out in accordance with standard methods using a 245pb probe and internal molecular weight marker<sup>2</sup>.

The different IS6110 profiles were analysed by computer using the Bionumerics software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) taking the size of fragments and number of IS6110 copies of each strain into consideration, as previously described<sup>9</sup>. Similarity ratios were calculated using the Dice coefficient and clusters analysis using UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A cluster was always defined in isolates of the *M. tuberculosis* complex of different patients presenting the same RFLP profile. Rate of genetic diversity was calculated by dividing the number of different profiles of RFLP by the total number of genotyped strains. Degree of recent transmission was calculated by division of the number of cluster strains, minus the num-





CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

culado dividindo o número de estirpes em *cluster* menos o número de *clusters* pelo total de estirpes tipadas<sup>10</sup>.

**Análise estatística**

A análise dos factores associados ao fenómeno de *clustering* foi efectuada usando a teste do qui-quadrado, calculando valores de *p* e *odds ratios* (OR) e intervalos de confiança (IC) a 95%

Foi usado um modelo de regressão binário para determinar que factores em simultâneo estariam associados ao facto de as estirpes estarem agrupadas em *cluster*.

ber of clusters, by the total number of genotyped strains<sup>10</sup>.

**Statistical analysis**

Analysis of factors associated to the clustering phenomenon was undertaken by use of the chi-square test, calculating *p* values and odds ratios (OR) and confidence interval (CI) of 95%.

The binary regression model was used to determine which factors were simultaneously associated to the strains being grouped in cluster.

**Resultados****Origem e idade dos doentes**

A informação acerca da nacionalidade estava disponível para 220 doentes: 173 (78,6%) eram portugueses e 47 (21,4%) imigrantes. Os imigrantes eram originários de Angola (n=17), Cabo Verde (n=17), Moçambique (n=4), São Tomé e Príncipe (n=2), Guiné-Bissau (n=3), Bulgária (n=2) e Roménia (n=2). Setenta doentes tinham nacionalidade desconhecida.

As idades dos doentes estavam compreendidas entre os 9 e os 91 anos, com uma média de 37 anos, e 74,8% (n=217) dos doentes eram do sexo masculino.

**Padrão de resistência aos antibacteriais**

O padrão de resistências foi determinado para as 290 estirpes. Cinquenta e uma (17,6%) estirpes eram resistentes a um ou mais antibacteriais. A monorresistência à INH, STP, RIF e PZA foi encontrada em 1,4%, 6,8%, 0,7% e 0,3% das estirpes, respectivamente. 23,5% (n=12) das estirpes resistentes eram também MR (4,1% do total de todas as estirpes).

**Results****Origin and age of patients**

Information on nationality was available in 220 patients: 173 (78.6%) were Portuguese and 47 (21.4%) immigrants. These foreign nationals were from Angola (n=17), Cape Verde (n=17), Mozambique (n=4), Sao Tome (n=2), Guinea-Bissau (n=3), Bulgaria (n=2) and Romania (n=2). The nationalities of 70 patients were unknown. Patients' ages ranged from nine to 91 years with an average of 37 years. Some 74.8% of the patients were male.

**Pattern of resistance to antibiotics**

Resistance pattern was determined for 290 strains. Fifty-one (17.6%) strains were resistant to one or more antibiotics. Mono-resistance to INH, STP, RIF, and PZA was found in 1.4%, 6.8%, 0.7% and 0.3% of strains, respectively. 23.5% (n=12) of resistant strains were also MDR (4.1% of total of all strains).



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

**Polimorfismo dos diferentes isolados de *M. tuberculosis***

Do total de 290 isolados de *M. tuberculosis*, encontramos 146 perfis diferentes de RFLP. O número de cópias da IS6110 variou de 2 a 16 cópias (9 cópias de média). Vinte (6,9%) isolados tinham menos do que 5 cópias de IS6110 e 23 (7,9%) tinham 5 cópias. Estas estirpes, com 5 ou menos cópias de IS6110, foram excluídas para efeitos de associação em *cluster* e análise estatística, na medida em que a análise por RFLP-IS6110 não tem poder discriminatório suficiente para o efeito. Para tal seria necessário efectuar um método alternativo de tipagem, como por exemplo o *spoligotyping*.

Os padrões de IS6110 foram analisados usando o *software* informático BioNumerics e o dendrograma construído de forma a permitir a visualização da relação entre as estirpes, tal como foi descrito por van Soolingen *et al* (1999) (Fig. 1).

A análise dos perfis mostrou um nível de similaridade entre padrões relativamente elevado, com uma relação de, pelo menos, 50% entre estirpes. Dos 106 perfis diferentes encontrados, 30 eram constituídos por 2 a 27 isolados.

**Análise de *clusters***

Das 247 estirpes analisadas e viáveis para o estudo, 60,7% (150) encontravam-se agrupadas em 30 *clusters* com padrões de RFLP idênticos (Fig. 1). Os *clusters* variavam em tamanho de 2 a 27 doentes.

O *cluster* maior (*cluster* Lisboa 3) inclui 27 isolados e o perfil de RFLP-IS6110 caracterizado por apresentar 11 bandas. Encontrámos mais 3 *clusters* dominantes (*cluster* O1, *cluster* Lisboa 2 e *cluster* B) com, respectivamente, 14, 12 e 12 isolados e 6, 12 e 9 bandas.

Para além dos *clusters* Lisboa 2 e Lisboa 3, foram encontrados mais 2 *clusters* pertencentes à

**Polymorphism of different *M. tuberculosis* isolates**

Of a total 290 *M. tuberculosis* isolates, we found 146 different RFLP profiles. The number of IS6110 copies varied from two to 16 (nine copies on average). Twenty (6.9%) isolates had less than five copies of IS6110 and 23 (7.9%) had five copies. These strains, with five or less copies of IS6110, were excluded for association effects in cluster and statistical analysis, as analysis by RFLP-IS6110 did not have sufficient discriminatory power. For this it would be necessary to use an alternative typing method, such as spoligotyping.

IS6110 patterns were analysed using BioNumerics software and the dendrogram produced allowed for visualisation of the relation between the strains, as described by van Soolingen *et al* (1999) (Fig.1).

Analysis of the profiles showed a relatively high level of similarity between patterns, with a relation of at least 50% between strains. Of the 106 different profiles found, 30 consisted of two to 27 isolates.

**Analysis of clusters**

Of the 247 strains analysed in the study, 60.7% (150) were found to be grouped in 30 clusters with identical RFLP patterns (fig. 1) Clusters varied in size from two to 27 patients.

The largest cluster (Lisbon 3 cluster) included 27 isolates and RFLP-IS6110 profile characterised by presentation of 11 bands. We found another three dominant clusters (cluster O1, Lisbon 2 cluster and cluster B) with, respectively, 14, 12, and 12 isolates and six, 12 and nine bands. In addition to the Lisbon 2 and Lisbon 3 clusters, another



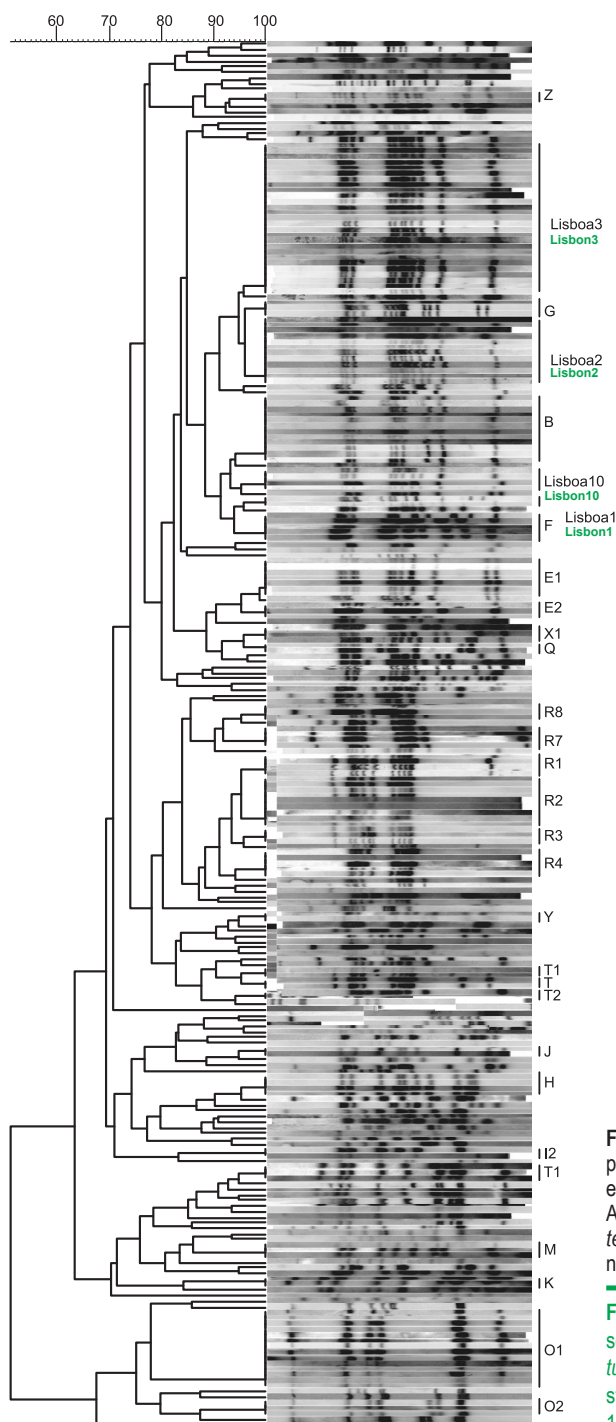


CMYK



## EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luis Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum



**Fig. 1** – Dendrograma construído a partir da comparação dos diferentes perfis de ADN das 247 estirpes de *M. tuberculosis* isoladas em Lisboa. As estirpes em cluster são designadas por clusters Lisboa (1, 2, 3 e 10) e por letras e números no lado direito

**Fig. 1** – Dendrogram constructed from comparison of different DNA profiles of 247 strains of *M. tuberculosis* isolated in Lisbon, Portugal. The strains in cluster are designated Lisboa 1, 2, 3 and 10 and by letters and number on the right side



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

Família Lisboa: Lisboa 10 (4 isolados) e Lisboa 11 (2 isolados).

As características clínicas e demográficas dos isolados em *clusters* com perfis únicos estão descritos no Quadro I. O factor de risco associado ao estar em *cluster* foi individualmente relacionado com o tipo de resistência (qui-quadrado  $p=0,009$ ) e com a categoria de novo caso de TB (qui-quadrado  $p=0,058$ ).

two clusters were found belonging to the Lisbon family: Lisbon 10 (four isolates) and Lisbon 11 (two isolates).

Clinical and demographic characteristics of isolates in clusters with unique profiles are described in Table I. The risk factor associated with being in cluster was individually related to the type of resistance (chi-square  $p=0.009$ ), and with the category of new TB

Quadro I – Características clínicas e demográficas dos doentes. Factores de risco para os casos de TB em *cluster*

	N.º (%) de doentes			p
	Total	em <i>cluster</i> (n = 150)	não em <i>cluster</i> (n = 97)	
Sexo:				
– masculino	188 (76,1)	114 (60,6)	74 (39,4)	1,000*
– feminino	59 (23,9)	36 (61,0)	23 (39,0)	
Grupo etário (anos):				
< 35	79 (32,0)	50 (63,3)	29 (36,7)	0,122
35-65	85 (34,4)	58 (68,2)	27 (31,8)	
>65	20 (8,1)	10 (50,0)	10 (50,0)	
– desconhecido	63 (25,5)	32 (50,8)	31 (49,2)	
Nacionalidade:				
– nascido em Portugal	145 (58,7)	89 (61,4)	56 (38,6)	0,154
– nascido no estrangeiro	44 (17,8)	31 (70,5)	13 (29,5)	
– desconhecido	58 (23,5)	30 (51,7)	28 (48,3)	
Local da doença:				
– pulmonar	172 (69,6)	100 (58,1)	72 (41,9)	0,396
– extrapulmonar		8 (3,2)	6 (75,0)	
– desconhecido	67 (27,1)	44 (65,7)	23 (34,3)	
Tipo de caso:				
– novo	140 (56,7)	76 (54,3)	64 (45,7)	0,058
– retratamento	21 (8,5)	15 (71,4)	6 (28,6)	
– desconhecido	86 (34,8)	59 (68,6)	27 (31,4)	
Padrão de resistência:				
– nenhuma	209 (84,6)	120 (57,4)	89 (42,6)	0,009
– outra mas não MDR	26 (10,5)	18 (69,2)	8 (30,8)	
– MDR	12 (4,9)	12 (100)	0 (0)	
Infecção VIH:				
– sim	71 (28,7)	45 (63,4)	26 (36,6)	0,656
– não	54 (21,9)	30 (55,6)	24 (44,4)	
– desconhecido	122 (49,4)	75 (61,5)	47 (38,5)	

p refere-se ao teste de hipótese de associação (qui-quadrado, excepto quando indicação em contrário)

\* Teste exacto de Fisher



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

**Table I** – Clinical and demographic characteristics of patients. Risk factors for TB cases in cluster

	N <sup>er</sup> (%) of patients			
	Total	in cluster (n = 150)	not in cluster (n = 97)	p value
Gender:				
– male	188 (76.1)	114 (60.6)	74 (39.4)	1.000*
– female	59 (23.9)	36 (61.0)	23 (39.0)	
Age group (years):				
< 35	79 (32.0)	50 (63.3)	29 (36.7)	0.122
35-65	85 (34.4)	58 (68.2)	27 (31.8)	
>65	20 (8.1)	10 (50.0)	10 (50.0)	
– unknown	63 (25.5)	32 (50.8)	31 (49.2)	
Nationality:				
– born in Portugal	145 (58.7)	89 (61.4)	56 (38.6)	0.154
– born overseas	44 (17.8)	31 (70.5)	13 (29.5)	
– unknown	58 (23.5)	30 (51.7)	28 (48.3)	
Location of disease:				
– lung	172 (69.6)	100 (58.1)	72 (41.9)	0.396
– outside lung	8 (3.2)	6 (75.0)	2 (25.0)	
– unknown	67 (27.1)	44 (65.7)	23 (34.3)	
Type of case:				
– new	140 (56.7)	76 (54.3)	64 (45.7)	0.058
– re-treatment	21 (8.5)	15 (71.4)	6 (28.6)	
– unknown	86 (34.8)	59 (68.6)	27 (31.4)	
Resistance pattern:				
– none	209 (84.6)	120 (57.4)	89 (42.6)	0.009
– other but noT MDR	26 (10.5)	18 (69.2)	8 (30.8)	
– MDR	12 (4.9)	12 (100)	0 (0)	
HIV infection:				
– yes	71 (28.7)	45 (63.4)	26 (36.6)	0.656
– no	54 (21.9)	30 (55.6)	24 (44.4)	
– unknown	122 (49.4)	75 (61.5)	47 (38.5)	

p refers to the hypothesis association test (Chi-squared except when indicated to contrary)

\* Fisher exact test

Usando uma regressão logística binária, após ajustamento de sexo, idade e infecção VIH, a ocorrência de um novo caso de TB aumenta em 2 vezes a probabilidade de estar em *cluster* (OR = 2,163, IC95% = 1,042-4,491), comparativamente com os casos desconhecidos. Para além disso, o facto de a origem do doente ser desconhecida também aumenta em 2 vezes a probabilidade de estar em *cluster*, compara-

case (chi-square p=0.058). Using logistic binary regression, after adjustment for gender, age and HIV infection, occurrence of a new TB case increased two-fold the probability of being in cluster (OR = 2.163, CI95% = 1.042-4.491), compared to unknown cases. Furthermore, the fact that a patient's origin is given as unidentified also increases two-fold the probability of being in cluster, in



CMYK



## EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

tivamente à nacionalidade portuguesa, embora esta associação possa ter uma relevância questionável.

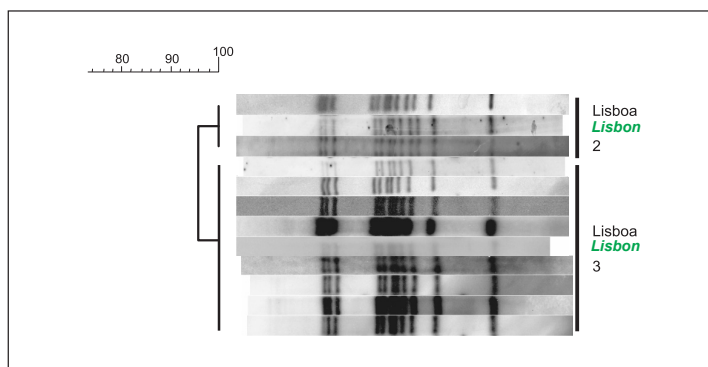
### Estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes

Na Fig. 2 apresenta-se o dendrograma das 12 estirpes de TB-MR analisadas. Estas estirpes são provenientes de 7 instituições hospitalares ou laboratórios de saúde. Nove estirpes pertenciam ao previamente descrito *cluster* Lisboa 3 e três estirpes ao *cluster* Lisboa 2.

comparison to Portuguese subjects, although this association could be of questionable relevance.

### Multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis*

Fig. 2 presents the dendrogram for the 12 strains of MDR-TB analysed. These strains come from seven hospitals or laboratories. Nine strains belonged to the previously described Lisbon 3 cluster and three strains to the Lisbon 2 cluster.



**Fig. 2** – Dendrograma construído a partir da comparação dos perfis de ADN de 12 estirpes de TB-MR isoladas em Lisboa, Portugal. As estirpes em *cluster* são designadas por *clusters* Lisboa 2 e 3

**Fig. 2** – Dendrogram constructed from comparison of different DNA profiles of TB-MR isolated in Lisbon, Portugal. The strains in cluster are designated Lisbon 2 and 3

### Análise das estirpes dos *clusters* Lisboa

As 45 estirpes agrupadas em *clusters* Lisboa (Lisboa 1, Lisboa 2, Lisboa 3 e Lisboa 10) representaram 18,2% do total dos isolados estudados (Fig. 1). Estas estirpes partilhavam, pelo menos, 9 dos fragmentos de IS6110 originados da digestão com a enzima de restrição *Pvu*II (cerca de 90% de similaridade), sugerindo que estirpes com estes perfis pertencem a um grupo molecular muito relacionado.

### Analysis of strains of Lisbon clusters

The 45 strains grouped in the Lisbon clusters (Lisbon 1, Lisbon 2, Lisbon, 3 and Lisbon 10) represented 18.2% of the total isolates under study (fig. 1). These strains shared at least nine fragments of IS6110 originating from digestion of the restriction enzyme *Pvu*II (around 90% similarity), suggesting strains with these profiles belong to a closely related molecular group.



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

As 12 estirpes TB-MR (23,5% do total dos resistentes) eram estirpes Lisboa e 16 estirpes (35,6%) apresentavam outro tipo de padrões de resistência. Os padrões de resistência das estirpes em *cluster* são apresentados no Quadro II. De uma maneira geral, verifica-se que o *cluster* Lisboa é responsável pela totalidade dos casos de TB-MR. Os isolados dos *clusters* Lisboa eram provenientes de diferentes fontes, sugerindo que estas estirpes podem estar disseminadas na área de Lisboa. As fontes hospitalares estão indicadas no Quadro III.

The 12 MDR-TB strains (23.5% of total resistants) were Lisbon strains and 16 strains (35.6%) presented another type of resistance pattern. Resistance patterns of strains in cluster are presented in Table II. Generally, it was found that the Lisbon cluster is responsible for all cases of MDR-TB.

Isolates of Lisbon clusters originated from different sources, suggesting that these strains could be disseminated in the Lisbon area. Hospital sources are shown in Table III.

Quadro II – Padrões de susceptibilidade das estirpes Lisboa de 45 doentes

Resistência	Clusters Lisboa				Total
	Lis 1	Lis 2	Lis 3	Lis10	
Susceptível	1	6	8	2	17
INH	1	0	1	0	2
SM	0	3	7	2	12
INH+SM	0	0	2	0	2
INH+RIF+SM	0	1	0	0	1
INH+RIF+SM+EMB	0	0	1	0	1
INH+RIF+SM+PZA	0	0	2	0	2
INH+RIF+SM+EMB+PZA	0	2	6	0	8
Total	2	12	27	4	45

INH= isoniazida; RIF=rifampicina; SM=estreptomicina; EMB=etambutol; PZA=pirazinamida; Lis = Lisboa

Table II – Susceptibility patterns of Lisbon strains in 45 patients

Resistance	Lisbon clusters				Total
	Lis 1	Lis 2	Lis 3	Lis10	
Susceptible	1	6	8	2	17
INH	1	0	1	0	2
SM	0	3	7	2	12
INH+SM	0	0	2	0	2
INH+RIF+SM	0	1	0	0	1
INH+RIF+SM+EMB	0	0	1	0	1
INH+RIF+SM+PZA	0	0	2	0	2
INH+RIF+SM+EMB+PZA	0	2	6	0	8
Total	2	12	27	4	45

INH= isoniazid; RIF=rifampicin; SM=streptomycin; EMB=ethambutol; PZA=pyrazinamide; Lis = Lisbon



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

Quadro III – Fonte hospitalar das estirpes Lisboa de 45 doentes

Hospital ou laboratório de saúde pública	Clusters Lisboa				
	Lis 1	Lis 2	Lis 3	Lis10	Total
A	1	4	5	–	10
B	–	1	1	–	2
E	–	–	1	–	1
F	–	–	1	–	1
H	–	–	1	–	1
I	–	–	1	–	1
L	–	2	2	–	5
M	–	–	1	–	1
N	1	1	4	–	7
O	–	–	2	–	2
P	–	1	1	–	2
Q	–	–	1	–	1
R	–	1	1	–	2
S	–	1	2	2	5
U	–	1	–	1	2
V	–	–	1	1	2
Total	2	12	26	3	45



Table III – Hospital source of Lisbon strains in 45 patients

Hospital or public health laboratory	Lisbon clusters				
	Lis 1	Lis 2	Lis 3	Lis10	Total
A	1	4	5	–	10
B	–	1	1	–	2
E	–	–	1	–	1
F	–	–	1	–	1
H	–	–	1	–	1
I	–	–	1	–	1
L	–	2	2	–	5
M	–	–	1	–	1
N	1	1	4	–	7
O	–	–	2	–	2
P	–	1	1	–	2
Q	–	–	1	–	1
R	–	1	1	–	2
S	–	1	2	2	5
U	–	1	–	1	2
V	–	–	1	1	2
Total	2	12	26	3	45





CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

**Discussão**

Em 1996, a incidência de casos de TB-MR aumentou drasticamente nos doentes VIH-positivos hospitalizados, particularmente na região de Lisboa, um dos distritos portugueses com maior incidência de TB<sup>7</sup>. Este problema levou o nosso grupo de investigação a fazer uma avaliação da dimensão do problema. O objectivo seria determinar se este aumento é devido a fenómenos de transmissão recente de uma estirpe, ou grupo de estirpes particular, ou fenómenos de transmissão nosocomial ou na comunidade. Neste estudo anterior, durante dois anos de vigilância, uma família predominante de estirpes (*cluster* A, agora designado por *cluster* Lisboa) resistente aos antibióticos INH, RIF, SM e, em alguns casos, EMB, foi isolada de 11 hospitais da região de Lisboa, particularmente de indivíduos infectados pelo VIH. O fenómeno de transmissão foi evidente nalguns casos, embora a Família Lisboa não estivesse nunca confinada a uma unidade ou local particular, tendo mesmo sido possível constatar que estas estirpes estariam disseminadas por Portugal. O nosso estudo centrou-se, na maioria, em estirpes de TB-MR. Embora tivéssemos também incluído estirpes sensíveis, nenhuma delas possuía um perfil compatível com os *clusters* Lisboa.

O presente estudo aparece, então, como pioneiro na avaliação da diversidade genética das estirpes de *M. tuberculosis* que circulam em Lisboa, dando uma especial atenção à Família Lisboa, de maneira a avaliar a sua possível permanência na incidência da infecção tuberculosa. Os 290 isolados estudados foram escolhidos aleatoriamente de 23 hospitais ou laboratórios hospitalares da área de saúde de Lisboa. Todas as estirpes estudadas tinham cultura positiva para diagnóstico de TB. Os polimorfismos genéticos das 290 estirpes isoladas no período de 18 meses que compreendeu o nosso estudo foi efectuado por

**Discussion**

Incidence of MDR-TB cases increased dramatically during 1996 in hospitalised HIV-positive patients, particularly in the Lisbon region, an area with one of the highest incidences of TB in Portugal<sup>7</sup>. This led our research team to undertake an evaluation of the scale of the problem.

The aim was to determine whether this increase is due to phenomena of recent transmission of a strain or a group of particular strains, or phenomena of hospital or community transmission. In this earlier study over two years, a family of mainly cluster A strains, now designated as Lisbon cluster, resistant to antibiotics INH, RIF, SM and, in some cases EMB, was isolated in 11 hospitals in the Lisbon region, especially from HIV-positive patients. Transmission was evident in some cases, although the Lisbon family was never confined to one particular unit or area. It is even possible that these strains could be spread throughout Portugal. Our study focussed mainly on MDR-TB strains. Although we also included sensitive strains, none of these had a profile compatible with the Lisbon clusters.

Our present study thus appears to be a pioneering one in the evaluation of the genetic diversity of *M. tuberculosis* strains circulating in Lisbon, paying special attention to the Lisbon family in order to evaluate its possible permanence in incidence of TB infection. The 290 isolates studied were picked at random from 23 hospitals or laboratories in the Lisbon health district. All strains studied had positive culture for TB diagnosis.

The genetic polymorphisms of the 290 strains isolated over the 18-month period of our study were carried out with RFLP using

**O presente estudo  
aparece como  
pioneiro na avaliação  
da diversidade  
genética das estirpes  
de *M. tuberculosis*  
que circulam em  
Lisboa**



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

RFLP usando a sequência de inserção IS6110 como sonda. Verificou-se que 188 estirpes (64,8%) estavam em *cluster*. No entanto, se excluirmos as 43 estirpes com 5 ou menos cópias de IS6110, onde se encontraram 5 *clusters*, a percentagem de isolados em *clusters* diminui para 60.7% (das 247 estirpes, 150 estavam organizadas em 30 *clusters*). Se tivermos em conta que doentes infectados com a mesma estirpe, ou seja, com estirpes com perfil de RFLP-IS6110 igual, são considerados epidemiologicamente relacionados e são indicativos de transmissão recente<sup>3, 11-15</sup>, podemos afirmar que ainda existem fenómenos de transmissão activa em Lisboa. De facto, se considerarmos que um *cluster* típico inclui o doente inicial (*index*) com a doença reactivada e outros doentes que adquiriram doença recentemente, podemos estimar que cerca de 50% (150-30) dos 247 casos são devidos a transmissão recente que progrediu para doença activa durante os 18 meses do nosso estudo. Esta descoberta pode ser resultado de um programa ineficaz de controlo de TB, embora tenham sido já desenvolvidos consideráveis esforços para reduzir a incidência de TB no nosso país. No entanto, a verdadeira dimensão dos casos de tuberculose devida a fenómenos de transmissão recente é provavelmente superior ao estimado neste estudo. De facto, uma vez que a análise por RFLP só pode ser usada em casos confirmados com cultura positiva, é possível que outros doentes tenham sido infectados, mas cuja infecção se tenha tornado latente e, portanto, não identificada. Por outro lado, o número de casos com cultura positiva representa apenas cerca de 49% do total de casos de TB notificados durante o mesmo período de tempo<sup>16</sup>.

Os padrões das estirpes de TB-MR foram submetidos para comparação numa base de dados europeia, *European MDR-TB Database* (Na-

the IS6110 insertion sequence with probe. It was found that 188 strains (64.8%) were in cluster. However, if we excluded the 43 strains with five or less copies of IS6110, where five clusters were found, the percentage of isolates in clusters fell to 60.7% (of 247 strains, 150 were grouped in 30 clusters). If we took into account the fact that patients infected with the same strain, or rather with strains with the same RFLP-IS6110 profile, are considered to be epidemiologically related and indicative of recent transmission<sup>3, 11-15</sup>, we can affirm that there are still phenomena of active transmission in Lisbon.

In fact, if we consider that the typical cluster included the initial patient (*index*) with the reactivated disease and other patients who recently acquired disease, we can estimate that around 50% (150-30) of 247 cases are due to recent transmission that progressed to active disease over the 18 months of our study. This discovery could be the result of an inefficient TB control programme, although considerable efforts have already been put into reducing TB incidence in Portugal. However, the true dimension of TB cases due to phenomena of recent transmission is probably higher than our study estimates. In fact, as analysis by RFLP is only used in confirmed cases with positive culture, it is possible that other patients were also infected but with latent infection and, therefore, were not identified. In contrast, the number of cases with positive culture represents only about 49% of total TB cases notified during the same period of time<sup>16</sup>.

Data from the European MDR-TB Database (National Institute of Public Health and the Environment RIVM) data were

**Os padrões das estirpes de TB-MR foram submetidos para comparação numa base de dados europeia**



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

**18,2% das 290  
estirpes analisadas  
pertencem à família  
Lisboa**

tional Institute of Public Health and the Environment – RIVM). Verificou-se que o *cluster* Lisboa 3 era idêntico ao *cluster* Europeu 10. Na realidade, encontramos padrões Lisboa 3 na França, Espanha e Holanda, embora alguns tenham origem portuguesa. Estes dados sugerem que a transmissão destas estirpes predominantes no nosso país possa estar a ocorrer internacionalmente.

Verificámos ainda a prevalência de estirpes particulares em Lisboa. De facto, 18,2% das 290 estirpes analisadas pertencem à família Lisboa. Estes *clusters* incluem não só estirpes MR como também estirpes com outras resistências ou mesmo sensíveis.

As estirpes pertencentes à Família Lisboa foram pela primeira vez isoladas em dois hospitais de Lisboa em 1992, embora, uma vez que há muita informação indisponível acerca dos casos de TB-MR em Portugal, estes surtos possam ter emergido anteriormente. Estas estirpes diferem entre si apenas por 1 ou 2 bandas (90% de similaridade), sugerindo que pertencem a um grupo genético muito conservado e relacionado. Se assumirmos que estas diferenças são devidas a mudanças evolucionárias de uma única estirpe, em vez de se tratar realmente de estirpes diferentes<sup>17</sup>, podemos estar a sobrevalorizar a verdadeira extensão do fenómeno de transmissão na comunidade. É possível que esta estreita relação entre as estirpes da Família Lisboa possa causar uma discriminação reduzida e, consequentemente, aumentar o número de estirpes em *cluster*. Para além disto, foi também sugerido que a análise por RFLP-IS6110 sobrevaloriza a transmissão recente, agrupando estirpes pouco relacionadas que possuam perfis moleculares que permaneceram inalterados durante grandes períodos de tempo<sup>17</sup>. No entanto, embora a investigação epidemiológica ainda esteja a decorrer, foi pos-

used for comparison of patterns from MDR-TB strains. It was found that the Lisbon 3 cluster was identical to European cluster 10. We found Lisbon 3 patterns in France, Spain and the Netherlands, although some were of Portuguese origin. These findings suggest that transmission of these strains common in Portugal could also be occurring internationally.

We also found a prevalence of particular strains in Lisbon. In fact, 18.2% of the 290 strains under analysis belong to the Lisbon family. These clusters included not only MDR strains but also those with other resistances or equally sensitive.

Strains belonging to the Lisbon family were isolated for the first time in two Lisbon hospitals in 1992, but as much information on MDR-TB cases in Portugal is unavailable, these could have emerged previously. These strains differ among themselves in only one or two bands (90% similarity), suggesting they belong to a very conserved and related genetic group. If we assume that these differences are due to evolutionary changes in a single strain instead of being different strains<sup>17</sup>, we could be overestimating the true extent of the phenomenon of transmission in the community. It is possible that this close relation between the Lisbon family strains could cause a reduced discrimination and, consequently, increase the number of strains in cluster. Further to this, it is also suggested that analysis by RFLP-IS6110 overestimated recent transmission, grouping strains with little interrelation with molecular profiles that remained unaltered for long periods of time<sup>17</sup>.

But although epidemiological research is still in progress, it was possible to establish some epidemiological links in some patients



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

sível estabelecer algumas relações epidemiológicas nalguns pacientes em *cluster* cujas estirpes pertencem à Família Lisboa. Estes dados apoiam a conclusão de que estes casos resultam de fenómenos de transmissão recente, embora a verdadeira prevalência de estirpes da Família Lisboa seja desconhecida, uma vez que estamos apenas a analisar uma pequena fracção da população global. Este facto, apenas demonstrado por técnicas moleculares, apoia a necessidade do uso destas metodologias na complementação da epidemiologia convencional. No entanto, as razões que levam a esta dominância das estirpes Lisboa continuam por esclarecer.

Embora o perfil genotípico mais disseminado a nível mundial seja o Beijing<sup>18</sup>, existem publicações que descrevem surtos provocados por outras estirpes dominantes. Na Dinamarca, a emergência de uma estirpe específica aumentou de 5,8% de todos os casos com cultura positiva isolados em 1992 para 29% em 2001. Este facto foi parcialmente justificado por estar associado a indivíduos jovens do sexo masculino com manifestações de doença pulmonar<sup>19</sup>. Outra estirpe também isolada em vários locais do mundo e, em particular, em algumas comunidade da África do Sul, designada por Família 11, foi tão bem sucedida na sua disseminação e prevalência quanto as estirpes Beijing, embora não se tenham sugerido nenhuma explicação para justificar a seu predomínio<sup>20</sup>. Em Manitoba, no Canadá, foi também encontrada uma estirpe dominante que representava mais de 25% do total de casos analisados entre 1992 e 1999. Foi sugerido que esta estirpe teria sido a primeira introduzida na região e que, provavelmente, a administração natural da BCG às crianças tenha promovido a selecção natural desta estirpe ao ter aumentado as defesas contra outras estirpes sensíveis através de fenómenos de imunidade selectiva<sup>21</sup>. Uma das hipóteses que foi sugerida para

in cluster, whose strains belonged to the Lisbon family. These data underline the conclusion that these cases result from phenomena of recent transmission, although the true prevalence of Lisbon family strains is unknown, as we are only analysing a small fraction of the total population. This fact, solely demonstrated by molecular techniques, stresses the need to use these methodologies alongside conventional epidemiology. The reasons for the dominance of the Lisbon strains remain to be clarified, however.

Although the most widespread genotype worldwide is the Beijing<sup>18</sup>, there are studies describing outbreaks caused by other dominant strains. In Denmark, the emergence of a specific strain increased from 5.8% in all cases with positive culture isolated in 1992 to 29% in 2001. This fact was partially justified by being associated to young male individuals with manifestations of lung disease<sup>19</sup>. Another strain, designated Family 11, also isolated in various places in the world, particularly in some communities in South Africa, was both successful in its dissemination and prevalence, while the Beijing strains have not offered any explanation to justify their predominance<sup>20</sup>. In Manitoba, Canada, a dominant strain was also found that accounted for 25% of total cases studied between 1992 and 1999. It was suggested that this strain had been the first to be introduced to the region and that normal administration of BCG to children had probably promoted natural selection of this strain to have raised defences against other sensitive strains through phenomena of selective immunity<sup>21</sup>. One hypothesis put forward to explain the wide dissemination of the Beijing genotype was its lowered suscep-

**As razões que levam a esta dominância das estirpes Lisboa continuam por esclarecer**





CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

explicar o sucesso da disseminação do genótipo Beijing foi a sua reduzida susceptibilidade às drogas anti-tuberculosas. É possível que o mesmo se esteja a passar com as estirpes da Família Lisboa, sendo que 23,5% são MR. Contudo, estirpes MR apresentam uma taxa de transmissão inferior à das estirpes sensíveis, um preço que estas estirpes têm de pagar para adquirir resistência através de mutações e, consequentemente, persistência. Sendo assim, a prevalência desta família de estirpes pode não ser resultado da sua reduzida susceptibilidade.

As estirpes analisadas apresentavam um grau de polimorfismo do ADN relativamente baixo, o que está de acordo com a elevada taxa de incidência portuguesa, mais de 31 casos de TB por 100 000 habitantes em 2005. Na realidade, encontraram-se 146 perfis diferentes de RFLP no total dos 290 isolados estudados. A elevada incidência de TB está normalmente associada a níveis mais baixos de diversidade<sup>22</sup>, embora esteja descrito que possa existir associação entre uma elevada diversidade de estirpes de *M. tuberculosis* em grandes populações urbanas com diferentes origens geográficas. No presente estudo, pelo menos 17,8% dos doentes nasceram no estrangeiro. Chevrel-Dellagi *et al.* (1993) conduziram uma análise em larga escala de genotipagem de estirpes de *M. tuberculosis* num país onde a tuberculose é endémica (Tunísia); verificaram que o estudo sistemático de áreas limitadas de regiões endémicas pode fornecer evidência da existência de epidemias persistentes e subvalorizadas<sup>23</sup>.

Um dos objectivos deste estudo foi a determinação do risco de transmissão recente de tuberculose, embora estejamos conscientes de que a falta de dados pode tornar difícil justificar os resultados obtidos. Dado que nos limitámos apenas ao estudo de alguns casos diagnosticados e notificados durante um período de 18

months to anti-tuberculosis drugs. It is possible that the same occurred in strains of the Lisbon Family, 23.5% of which are MDR. However, MDR strains present a lower transmission rate than sensitive strains, a price that these strains pay to acquire resistance via mutations and, as a consequence, persistence. Thus, the prevalence of this family of strains might not be the result of their reduced susceptibility.

The strains analysed presented a relatively low degree of DNA polymorphism, which is in keeping with the high rate of Portuguese incidence – more than 31 TB cases per 100,000 inhabitants in 2005. A total 146 different RFLP profiles were found from 290 isolates studied. Heightened TB incidence is normally associated to lower levels of diversity<sup>22</sup>, although some research describes a possible association between a high diversity of *M. tuberculosis* strains in major cities with diverse ethnicity. In our study, at least 17.8% of patients were born overseas. Chevrel-Dellagi *et al.* (1993) carried out a large-scale study on genotyping of *M. tuberculosis* strains in Tunisia, a country where TB is endemic. This research showed that systemic study in limited areas of endemic areas can supply evidence of existence of persistent and undervalued epidemics<sup>23</sup>. One of the goals of this study was the determination of risk of recent transmission of TB, although we were aware that shortage of data could make it difficult to justify the results obtained. As we limited our research to cases diagnosed and notified during an 18-month timescale, our analysis of risk factors only included a subgroup of patients whose infection progressed to active disease in this period. Cases of MDR-TB were a determining factor for the clustering pheno-

**Um dos objectivos deste estudo foi a determinação do risco de transmissão recente de tuberculose**



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

meses, a análise dos factores de risco inclui apenas o subgrupo de doentes cuja infecção progrediu para doença activa nesse intervalo. Os casos de TB-MR foram um factor determinante para o fenómeno de *clustering* nos doentes para os quais havia informação disponível. O facto de a MR contribuir para a transmissão de tuberculose não é surpreendente, na medida em que, no período entre 2000 e 2002, as taxas de MR em novos casos e retratamentos foi de 2,3% e de 10,4%, respectivamente<sup>16</sup>. O segundo relatório global acerca da luta contra a resistência aos antibacteriais (Organização Mundial de Saúde) menciona um ponto de referência de 3% de prevalência de MR entre novos casos para definir *hot spots*<sup>24</sup>, embora muitos dos factores analisados no terceiro relatório<sup>25</sup> determinem a extensão à qual a MR se torna um problema num determinado país ou área geográfica. Os dados portugueses não são analisados nestes dois relatórios. No entanto, mesmo que os nossos resultados não estejam em níveis alarmantes, estão certamente acima da média dos casos notificados nos países da Europa Central e de Leste, que registaram uma resistência primária inferior a 1%<sup>25</sup>. Os casos de TB-MR foram fortemente associados aos doentes VIH-positivo (65% dos doentes MR em *cluster* estavam infectados), embora tenhamos também verificado que o VIH, por si só, não constitui um factor de risco significativo associado ao facto de estar em *cluster*.

Em suma, a tipagem por RFLP de estirpes de *M. tuberculosis* escolhidas aleatoriamente fornece uma perspectiva geral das estirpes envolvidas na infecção tuberculosa na área de Lisboa. Tanto a elevada incidência de tuberculose como a taxa de *clustering* mostram que é necessário instituir estratégias efectivas de prevenção e controlo para diminuir o número de casos de tuberculose em Portugal.

menon in patients for which there was no available information. The fact that MDR plays a role in tuberculosis transmission is not surprising. Between 2000 and 2002 MDR rates in new cases and re-treated patients were 2.3% and 10.4%, respectively<sup>16</sup>. The second global report on the fight against antibiotic resistance (World Health Organization) cites a reference point of 3% of MDR prevalence among new cases to define hot spots<sup>24</sup>, although many factors examined in the third report<sup>25</sup> highlighted the extent to which MDR becomes a problem in certain countries or a region. Portuguese data are not analysed in these two reports of anti-tuberculosis drug resistance. However, even if our results do not cite alarming levels, they are undoubtedly above average for notified cases in countries in central and Eastern Europe, which register primary resistance of below 1%<sup>25</sup>. Case of MDR-TB were strongly related to HIV-positive patients (65% of MDR patients in cluster were infected), although we have shown that HIV by itself is not a significant risk factor through being in cluster.

In conclusion, RFLP genotyping of *M. tuberculosis* strains chosen at random offers a general perspective of strains involved in tubercular infection in the Lisbon region. Both the high incidence of TB and the rate of clustering underline the need to implement effective prevention and control strategies to reduce the number of tuberculosis cases in Portugal.

**Aknowledgements**

This study was funded by the Foundation for Science and Technology (grant POCTI/ESP/42941/2001).

A tipagem por RFLP de estirpes de *M. tuberculosis* escolhidas aleatoriamente fornece uma perspectiva geral das estirpes envolvidas na infecção tuberculosa





CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luís Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

**Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (bolsa FCT POCTI/ESP/42941/2001).

Os autores querem agradecer ao Dr. Paulo Nogueira, do Onsa – Observatório Nacional de Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pela análise estatística; ao grupo de trabalho que participou no projecto: Dra. Maria de Lurdes Carrilho (Hospital de Pulido Valente), Prof. Dr. Miguel Viveiros (Instituto de Higiene e Medicina Tropical), Dr. João Lago (Hospital Militar de Belém), Dra. Judite Quirin (Hospital de S. Bernardo), e Dra. Hermínia Choon (Hospital de St. Marta) pela recolha e processamento dos dados; e à equipa da Unidade de Micobactérias do Centro de Bacteriologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, cuja qualidade de serviço e cooperação tornaram este trabalho possível.

The authors would like to thank Dr Paulo Nogueira do Onsa – National Health Observatory, the Dr Ricardo Jorge National Institute of Health, for statistical analysis, the working group that took part in the project: Dr Maria de Lurdes Carrilho (Hospital Pulido Valente), Prof. Miguel Viveiros (Institute of Tropical Health and Medicine), Dr João Lago (Hospital Militar de Belém), Dr Judite Quirin (Hospital de S. Bernardo), and Dr Hermínia Choon (Hospital de St. Marta) for collection and processing of data; and the Microbacteria Unit of the Bacteriology Centre of the Dr Ricardo Jorge National Institute of Health, whose quality of service and cooperation made this study possible.

**Bibliografia / Bibliography**

1. Direcção Geral de Saúde. Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose. Ponto da situação epidemiológica e de desempenho. 2003.
2. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31:406-9.
3. van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med 2001;249:1-26.
4. Yang ZH, Bates JH, Eisenach KD, Cave MD. Secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with matching IS6110 fingerprints from different geographic regions of the United States. J Clin Microbiol 2001;39:1691-5.
5. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, *et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: inter-laboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999;37:2607-18.
6. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, *et al.* Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. J Clin Microbiol 1997;35:907-14.
7. Portugal I, Covas MJ, Brum L, *et al.* Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. Int J Tub Lung Dis 1999;3:207-13.
8. David H, Levy-Frébault V, Thorel ME. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. 1989 Institut Pasteur, Paris.
9. Hermans P W, Messadi F, Guebrexabher H, *et al.* Usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J Inf Dis 1995;171:1504-13.
10. Murray M, Alland D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. Am J Epidemiol 2000;155: 565-71.
11. van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PEW, *et al.* Molecular epidemiology in the Netherlands: a nation-wide study from 1993 through 1997. J Inf Dis 1999; 180: 726-736.



CMYK

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LISBOA

Isabel Portugal, Luis Barreiro, Tiago Vultos, Rita Macedo, Cristina Furtado, António Fonseca Antunes, Laura Brum

12. Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. *Bull World Health Organ* 2002;80:477-82.
13. Bauer J, Yang Z, Poulsen S, Andersen AB. Results from 5 y of nation-wide DNA fingerprint of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 1998;36:305-8.
14. van Soolingen D, Hermans P W, de Haas PEW, Soll D R, van Embden J D A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2578-86.
15. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, *et al.* The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N Engl J Med* 1994;330:1703-9.
16. Direcção Geral de Saúde. Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose. Ponto da situação epidemiológica e de desempenho. 2002.
17. Yeh RW, Ponce de León A, Agasino CB, *et al.* Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis* 1998;177:1170-1111.
18. Glynn J R, Whiteley J, Bifani P J, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002;8:843-9.
19. Lillebaek T, Dirksen A, Kok-Jensen A, Andersen A.B. A dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain emerging in Denmark. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1001-6.
20. Victor T C, de Haas P, Jordaan A, *et al.* Warren R. Molecular characteristics and global spread of *Mycobacterium tuberculosis* with a Western Cape F11 genotype. *J Clin Microbiol* 2004;42:769-72.
21. Blackwood K, Al-Azem A, Elliott L, Hershfield E, Kabani A. Conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Manitoba. *BMC Infect Dis* 2003;3:1-11.
22. Hermans P W, Messadi F, Guebrevabher H, *et al.* Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995;171:1504-13.
23. Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Kou-baji H, Gicquel B, Dellagi K. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2446-50.
24. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the World. Report No.2: Prevalence and trends. 2000. WHO/CDS/TB/2000.278. Geneva: WHO, 2000.
25. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the World. Report No.3. 2004. WHO/, Geneva: WHO, 2004.

