

Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre, (RS)*

Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from an outpatient clinic in Porto Alegre, (RS)

MICHELE BORGES, PATRÍCIA IZQUIERDO CAFRUNE, LIA GONÇALVES POSSUELO, ANDRÉIA ROSANE DE MOURA VALIM, MARTA OSÓRIO RIBEIRO, MARIA LUCIA ROSA ROSSETTI

Introdução: A tuberculose é uma doença antiga que ainda se mantém como um dos maiores males da humanidade no século XXI. Nas últimas décadas, o advento de novas tecnologias utilizando os conhecimentos de biologia molecular tem levado a um aumento na investigação da etiologia, detecção e epidemiologia da tuberculose.

Objetivo: Avaliar o grau de similaridade entre as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes do setor de tisiologia do Centro de Saúde Navegantes, de Porto Alegre (RS).

Método: Foi realizado um estudo retrospectivo utilizando 55 amostras de escarro de pacientes atendidos ambulatorialmente no Centro de Saúde Navegantes para realização da técnica de RFLP. Os resultados obtidos pela genotipagem foram correlacionados com os dados gerados a partir da epidemiologia convencional.

Resultados: Trinta e nove isolados (70,9%) apresentaram padrão único, enquanto dezesseis isolados (29,1%) apresentaram padrões agrupáveis e formaram 8 *clusters*, com 2 pacientes em cada. Foi encontrada relação epidemiológica em 6 (37,5%) dos 16 pacientes em *cluster*.

Conclusão: A associação adequada entre epidemiologia convencional e genotipagem de *M. tuberculosis* contribui para um melhor entendimento da dinâmica de transmissão da tuberculose mesmo quando o estudo é realizado em um único local.

Background: Tuberculosis is an ancient disease, which still remains one of the major ills faced by mankind in the 21st century. In recent decades, new technologies employing the knowledge gained from molecular biology studies have allowed for more accurate detection of tuberculosis and increased investigation of the etiology and epidemiology of the disease.

Aim: Evaluating the degree of similarity among strains of *Mycobacterium tuberculosis* provided by the Phthisiology Sector of Centro de Saúde Navegantes (Navegantes Health Clinic) in Porto Alegre, RS, Brazil.

Method: A retrospective study was performed involving RFLP typing of 55 sputum samples from outpatients examined at the Centro de Saúde Navegantes. The results of the genotyping were correlated to the conventional epidemiology data.

Results: A single pattern was seen in 39 (70.9%) of the isolates, whereas 16 isolates (29.1%) showed clustering patterns and were grouped into 8 clusters of 2 patients each. An epidemiological link was found for 6 (37.5%) of the 16 patients in the clusters.

Conclusion: The appropriate combination of conventional epidemiology and genotyping of *M. tuberculosis* contributes to a better understanding of the dynamics of tuberculosis transmission even when such a study is performed in a single, isolated health clinic.

J Bras Pneumol 2004; 30(4) 448-54

Descritores: *Mycobacterium tuberculosis*. Transmissão. RFLP. Epidemiologia.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*. Transmission. Polymorphism, Restriction Fragment Length. Epidemiology.

*Trabalho realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CDCT/FEPPS, Porto Alegre, RS/Brasil
Endereço para correspondência: Michele Borges. Av. Ipiranga, 5400, Bairro Jardim Botânico CEP:90610-000. Porto Alegre, RS, Brasil. Email: micheborges@yahoo.com.br
Apoio financeiro: CNPq e Rede Brasileira de Pesquisa em TB (REDE-TB)/Processo 62.0055/01-4-PACDT-Milenio.
Recebido para publicação, em 20/2/04. Aprovado após revisão, em 25/5/04.

INTRODUÇÃO

A tuberculose não tem bandeira, uniforme ou pátria. Acompanha o homem há muito tempo, talvez desde a época em que ele passava à condição de bípede. Existem relatos de evidência de TB em ossos humanos pré-históricos⁽¹⁾. Estudos moleculares recentes indicam que o agente causal da TB, o *Mycobacterium tuberculosis*, tem residido no organismo humano há aproximadamente 10.000 anos, quando se começou a domesticar o gado⁽²⁾. Mesmo hoje, mais de cem anos após Robert Koch (1882) ter identificado o agente causador da doença, ela ainda se mantém como uma das infecções crônicas de maior índice de morbidade e mortalidade.

O aumento na incidência da TB nas últimas duas décadas é atribuído à deterioração dos sistemas de saúde pública, à pandemia do HIV, ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos e à alta correlação entre a doença e a pobreza⁽³⁾.

Apesar de um programa nacional de controle da TB, o Brasil notifica cerca de 90.000 casos novos por ano, entretanto a estimativa anual da tuberculose é de 129.000 casos novos⁽⁴⁾. No Rio Grande do Sul, no ano de 2000, a taxa de incidência de TB foi de 55,7/100.000 habitantes e foram notificados 6.152 casos novos da doença, dos quais 65% ocorreram na região metropolitana de Porto Alegre⁽⁵⁾.

O conhecimento da dinâmica de transmissão da TB tem sido melhorado pelo uso de técnicas de genotipagem que permitem a diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. A doença ativa se desenvolve tanto após uma infecção adquirida recentemente, quanto pela reativação de uma infecção adquirida em um passado remoto^(3,6). Em um estudo populacional, foi postulado que pacientes com TB portando cepas com um padrão único são considerados casos de TB por reativação, e aqueles pacientes com isolados que compartilham padrões indistinguíveis são considerados pertencentes a *clusters*, e representam doença decorrente de uma infecção adquirida recentemente^(6,7).

A técnica de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") que utiliza o elemento de inserção IS6110 para análise de polimorfismo é o método de genotipagem mais amplamente utilizado para diferenciação de cepas de *M.*

Siglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho:

CSI-	Centro de Saúde Navegantes
CTAB-	Brometo de cetil-trimetil-amônio
DNA-	Ácido desoxirribonucléico
EMB-	Etambutol
ETH-	Etionamida
FEPPS-	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
HIV-	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH-	Isoniazida
IS-	Seqüência de Inserção
MDR-	Multirresistente
PZA-	Pirazinamida
RMP-	Rifampicina
RFLP-	"Restriction Fragment Length Polymorphism"
TB-	Tuberculose

tuberculosis e tem se mostrado muito útil na realização de diferentes tipos de estudos epidemiológicos^(6,8).

Considerando a necessidade de um maior conhecimento sobre a transmissão da tuberculose, o objetivo do estudo foi avaliar o grau de similaridade entre as cepas de *M. tuberculosis* provenientes do Setor de Tisiologia do Centro de Saúde Navegantes de Porto Alegre, aliando técnicas de biologia molecular à epidemiologia convencional.

MÉTODO

Pacientes e Amostras

Os isolados de *M. tuberculosis* utilizados no estudo foram provenientes da rotina do Laboratório de Tuberculose do IPB-LACEN/RS, que recebe amostras de pacientes do Setor de Tisiologia do Centro de Saúde Navegantes (CSI), uma unidade ambulatorial localizada na região norte de Porto Alegre. Foram analisadas 55 amostras de escarro de pacientes do CSI, do período de 1999 e 2000 que, além da cultura primária, foram testadas quanto a sua susceptibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Os dados clínico-demográficos dos pacientes foram obtidos através dos prontuários médicos, pela revisão dos livros de registros laboratoriais e revisão do banco nacional de notificação de TB (SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (CEP-FEPPS/RS).

Cultura do Microrganismo e Teste de Susceptibilidade

As amostras clínicas foram cultivadas através do método de KUDOH & KUDOH⁽⁹⁾. O teste de susceptibilidade aos fármacos, foi realizado segundo o método das proporções utilizando os seguintes fármacos: RMP (40µg/mL), INH (0,2µg/mL), SM (4µg/mL), EMB (2µg/mL), PZA (100µg/mL) e ETH (20µg/mL), como descrito por CANETTI *et al.*⁽¹⁰⁾. Foram consideradas cepas multirresistentes (MDR) aquelas que apresentaram resistência a pelo menos isoniazida (INH) e rifampicina (RMP).

A técnica de Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP do IS6110

O DNA genômico foi extraído pelo método de CTAB e o RFLP do IS6110 foi realizado conforme protocolo elaborado por VAN EMBDEN *et al.*⁽¹¹⁾.

Análise dos dados

As imagens digitalizadas do RFLP do IS6110 foram analisadas através do *software* GelCompar (versão 4.2, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) juntamente com a análise visual. Os dados clínico-demográficos dos pacientes foram analisados pelo *software* EpiInfo (versão 6.04d, Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC, EUA).

RESULTADOS

Dentre os 55 isolados de *M. tuberculosis* analisados pela técnica de RFLP, foram identificados 47 padrões de bandas distintos. Trinta e nove isolados (70,9%) com padrão único e dezesseis isolados (29,1%) apresentaram padrões agrupáveis. Os isolados que apresentaram 6 ou menos cópias de IS6110 representam 5,4% do total de amostras analisadas, os demais 94,6% apresentaram um número de 7 ou mais cópias do elemento de inserção. O número de bandas variou de 2 a 18. A média e a moda foram de 10 cópias de IS6110 por isolado.

Foram considerados *cluster* os isolados que apresentaram 100% de similaridade. Dos 55 isolados analisados, 16 isolados formaram 8 *clusters* distintos que foram denominados CL I, CL II, CL III, CL IV, CL V, CL VI, CL VII e CL VIII. Cada um dos *clusters* foi composto por 2 isolados. Dentre os padrões de cepas obtidos no RFLP, foram identificados 3 padrões pertencentes à família A encontrada em SP⁽⁶⁾ (Figura 1). Os padrões foram comparados visualmente entre si e com a cepa de

referência *M. tuberculosis* 14323, utilizada como marcador externo em cada gel.

Foi considerada ligação epidemiológica entre aqueles pacientes em *cluster* que compartilhavam a mesma residência, moravam no mesmo bairro ou apresentavam relação de parentesco. Foi observada relação epidemiológica para 6 pacientes (37,5%) em 3 dos 8 *clusters* identificados. A ligação entre estes pacientes foi devido à proximidade de habitação ou relação de parentesco.

A média de idade dos pacientes que desenvolveram TB devido à transmissão recente foi de 42 anos e devido à reativação, 43 anos. Não houve diferença significativa entre as médias de idade dos pacientes do gênero feminino quando comparados em relação à transmissão recente ou reativação. O mesmo ocorreu entre os pacientes do gênero masculino.

Durante os anos de 1999 e 2000, o CSI notificou 837 casos novos de TB, dos quais 55 (6,57%) foram encaminhados para o Laboratório de Tuberculose do IPB-LACEN/RS. Somente são encaminhadas para cultura, amostras de pacientes que não responderam ao Esquema I, o que explica o alto percentual (90,9%) de pacientes com tratamento prévio no estudo (Tabela 1).

Quarenta isolados (72,7%) apresentaram diferentes perfis de resistência e apenas quinze (27,3%) isolados eram susceptíveis a todos os fármacos utilizados no tratamento da TB. Vinte e três (41,8 %) isolados eram resistentes a um ou mais fármacos e dezessete (30,9%) eram MDR.

Com relação a fatores que possam estar associados com o desenvolvimento da tuberculose, não foi identificada associação significativa entre dados clínico-demográficos com os isolados em *cluster* (Tabela 1). Apesar disso, os dados encontrados em relação aos pacientes infectados com cepas resistentes sugerem a importância dos mesmos na cadeia de transmissão recente.

DISCUSSÃO

Até pouco tempo atrás, era quase impossível identificar cepas individuais de *M. tuberculosis* e, em consequência, acompanhar a transmissão de uma determinada cepa numa região e/ou instituição. Nos últimos anos, os métodos tradicionais de coleta epidemiológica de dados têm sido complementados por métodos de genotipagem.

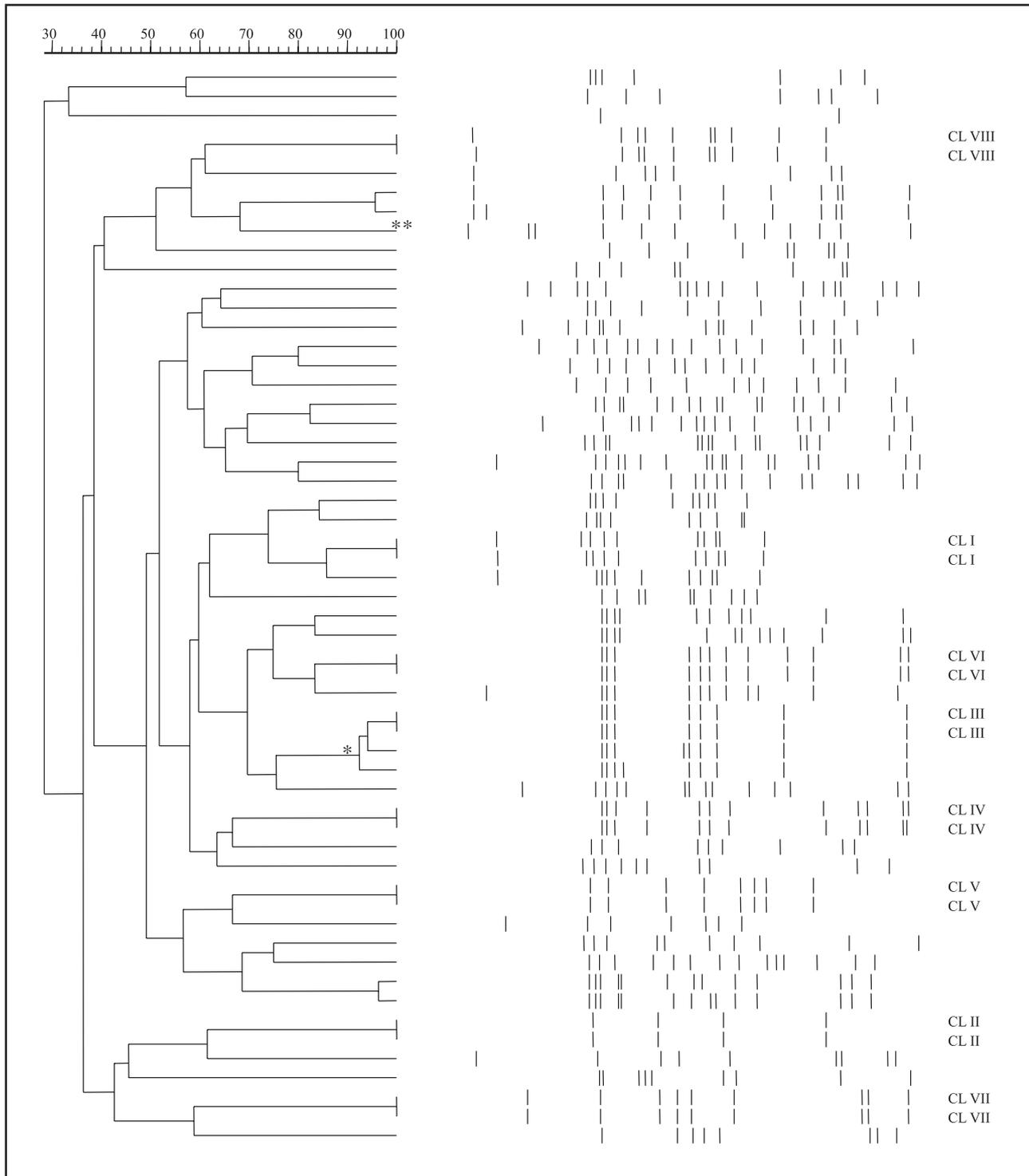


Figura 1. Dendrograma representando os diferentes padrões de RFLP encontrados em isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes atendidos no CSI. Os *clusters* foram denominados CL I, CL II, CL III, CL IV, CL V, CL VI, CL VII, CL VIII.

* Padrões de cepas pertencentes à família A encontrada em SP⁽⁶⁾.

** Cepa de referência de *M. tuberculosis* 14323.

TABELA 1
Características clínico-demográficas dos pacientes analisados no estudo.

Características	Cluster (%)	Não <i>cluster</i> (%)	Valor de <i>p</i>	Total
Gênero				
Masculino	13 (28,9)	32 (71,1)	0,6	45 (81,8)
Feminino	3 (30)	7 (70)		10 (18,2)
Raça				
Branco	13 (30,2)	30 (69,8)		43 (78)
Negro	2 (33,3)	4 (66,7)	0,77	6 (11)
Desconhecido	1 (16,7)	5 (83,3)		6 (11)
Tratamento Prévio				
Não	3 (60)	2 (40)	0,14	5 (9,1)
Sim	13 (26)	37 (74)		50 (90,9)
Resistência				
Não	2 (13,3)	13 (86,7)	0,1	15 (27,3)
Sim	14 (35)	26 (65)		40 (72,7)
MDR				
Não	11 (28,9)	27 (71,1)	0,6	38 (69,1)
Sim	5 (29,4)	12 (70,6)		17 (30,9)
HIV				
Negativo	9 (34,6)	17 (65,4)		26 (47,3)
Positivo	1 (14,3)	6 (85,7)	0,56	7 (12,7)
Desconhecido	6 (27,3)	16 (72,7)		22 (40)

Através da análise por RFLP dos isolados de *M. tuberculosis* obtidos dos pacientes, foi encontrada uma proporção de pacientes em *cluster* de 29,1%, semelhante àquela relatada em estudos realizados com isolados do Rio de Janeiro e São Paulo, que foram de 22% e 33%, respectivamente^(12,8). Na região metropolitana de Porto Alegre o percentual de *cluster* foi de 34,5%⁽¹³⁾. Logo, os esforços para o controle da doença devem estar voltados não somente para interromper a cadeia de transmissão, mas também prevenir reativação. Este resultado é bastante semelhante àqueles descritos em outros estudos realizados no Brasil (Tabela 2). Foram observados padrões com uma média de 10 bandas por isolado, assim como descrito em diversos estudos⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Apesar de 81,8% dos pacientes serem do gênero masculino, a taxa de transmissão recente não diferiu daquela encontrada para o gênero feminino, indicando que ser do gênero masculino é um fator de risco para desenvolvimento da TB, mas que não está necessariamente associado com maior taxa de transmissão recente^(6,8,17,18). Em relação à raça, não foi observada diferença significativa nas proporções de pacientes em *cluster*, entretanto há uma tendência maior dos pacientes da raça

negra desenvolver TB devido à transmissão recente. A diferença provavelmente não foi significativa devido ao pequeno número de pacientes da raça negra no estudo, porém estes representam apenas 5,2% da população do Estado do Rio Grande do Sul, enquanto os da raça branca representam 86,3%⁽¹⁹⁾. Estes dados indicam que ser da raça negra pode ser um fator de risco para desenvolvimento da TB e também frequentemente associado com transmissão recente⁽⁶⁾. Isto está provavelmente associado à situação sócio-econômica destes pacientes, apesar de existirem alguns trabalhos investigando a possibilidade de fatores genéticos estarem influenciando nessa maior susceptibilidade⁽²⁰⁾.

No presente estudo, foi observado que 14,3% dos pacientes HIV positivos desenvolveram TB devido à transmissão recente, não referindo significativamente em relação aos pacientes HIV negativos, cujo percentual foi de 34,6%. Provavelmente em razão do número pequeno amostral, tais dados diferem do relatado na literatura, pois os pacientes HIV positivos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de TB tanto devido à reativação quanto à uma infecção adquirida recentemente⁽³⁾.

TABELA 2
 Comparação dos resultados encontrados em alguns estudos de epidemiologia molecular realizados no Brasil.

Origem dos isolados	Local de Estudo	Período do Estudo	n	Cópias de IS6110	Padrão Cluster	Status HIV	Referência
Porto Alegre, RS	Ambulatorial	1999-2000	55	2-18	29,1%	26 HIV Neg 7 HIV Pos 22 Des	Presente Estudo
RJ	Hospital	1993-1994	19	6-15	53%	15 HIV Pos 4 HIV Neg	Ivens-de-Araújo <i>et al.</i> ⁽²⁷⁾
RJ	Hospital	1990-1994	32	---	25%	---	Lourenço <i>et al.</i> ⁽²⁸⁾
Bauru, SP	Ambulatorial	1996-1999	57	3-17	26,3%	25 HIV Pos 19 HIV Neg 13 HIV Des	Baptista <i>et al.</i> ⁽²⁹⁾
Campinas, SP	Hospital	1996-1999	78	6-21	22,3%	---	Calusni <i>et al.</i> ⁽¹⁶⁾
RJ	Hospital	1993-1994	120	3-18	19%	67 HIV Neg 30 HIV Pos 23 Desc	Fandinho <i>et al.</i> ⁽¹⁵⁾
SP	Ambulatorial	1995-1997	293	2-20	33%	142 HIV Neg 151 HIV Pos	Ferrazoli <i>et al.</i> ⁽⁸⁾
RJ, RS	Ambulatorial Hospital	1991-1994	219	1-18	22%	-----	Suffys <i>et al.</i> ⁽¹²⁾

Através da análise dos dados clínicos, foi possível identificar relação epidemiológica para 6 pacientes (37,5%) que desenvolveram a doença devido à transmissão recente. O percentual encontrado no presente estudo para relação epidemiológica foi semelhante aos encontrados em trabalhos realizados no Missouri (46%), Hong Kong (30,2%) e Arkansas (42%)^(21,22,23).

O alto nível de resistência (72,7%) a pelo menos um fármaco encontrado no presente estudo, está diretamente relacionado com a seleção amostral. A história de tratamento prévio é um fator predisponente à seleção de bacilos resistentes⁽²⁴⁾, sendo que entre os pacientes analisados foi observado que 90,9% já haviam realizado tratamento anterior.

A associação entre transmissão recente e resistência não foi significativa, porém foi observado que 35% dos pacientes portadores de cepas resistentes desenvolveram TB devido à transmissão recente. Outros estudos também demonstraram uma importante contribuição destes pacientes (com cepas resistentes) na formação de *cluster*^(6,8,15,25,29), o que pode estar relacionado à dificuldade na detecção da resistência e no tratamento destes pacientes, pois é mais demorado, mais tóxico e mais caro do que daqueles infectados com cepas sensíveis, com taxas mais baixas de cura e maior propensão de

permanecerem infectantes por mais tempo⁽²⁶⁾.

Apesar do estudo ser limitado ao Centro de Saúde Navegantes, foi encontrada uma grande diversidade de padrões entre as cepas de *M. tuberculosis* analisadas e uma alta taxa de relação epidemiológica entre os pacientes pertencentes a *cluster*, que pode ser atribuída à combinação adequada de técnicas de epidemiologia convencional à genotipagem, fornecendo uma visão geral da dinâmica de transmissão da doença neste local.

AGRADECIMENTOS

À enfermeira Mara Pessini do Setor de Tisiologia do Centro de Saúde Navegantes pela gentileza de fornecer dados necessários para a realização do estudo. Ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Conde MB, Souza GM, Kritski AL. Tuberculose sem medo. Editora Atheneu. 1ª ed. São Paulo: 2002.
2. Young DB. Blueprint For The White Plague. Nature 1998; 393.
3. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. Clin Microbiol 1995; 8:180-99.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Manual técnico para o controle da Tuberculose: Cadernos de atenção básica. Brasília; 2002.
5. SES-RS. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Programa de Controle da Tuberculose; 2003.

6. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco; A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330:1703-9.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18:426-39.
8. Ferrazoli L, Palaci M, Marques LRM, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:1-8.
9. Kudoh S, Kudoh TA. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bulletin of the WHO* 1974; 51:71-82.
10. Canetti GW, Fox A, Khomenko HT, Mahler NK, Menon D A, Mitchison N, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull.WHO* 1969; 41:21-43.
11. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31:406-9.
12. Suffys PN, Ivens de Araújo ME, Rossetti ML, Zaha A, Barroso EW, Barreto AMW, et al. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol* 2000; 151:343-51.
13. Possuelo LG. Epidemiologia Molecular da Tuberculose na Região Metropolitana de Porto Alegre. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica, 2003.
14. Niemann S, Rüscher-Gerdes S, Richter, E. IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3015-20.
15. Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde HR, Ferreira RMC, Saad MHF, et al. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med and Hygiene* 2000; 94:271-5.
16. Calusni ALR, Roscani GN, Villares MC, Soini H, Graviss E, Ramos MC. IS6110 Restriction Fragment Polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil; Evidence of International Distribution of Strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:655-8.
17. Diel R, Schneider S, Meywald-Walter K, Ruf CM, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. *J Clin Microbiol* 2002; 40:532-9.
18. Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998; 36:486-92.
19. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2000; Tabela 136. <http://www.ibge.gov.br/SIDRA>.
20. Stead WW. Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics? *Int Tuberc Lung Dis* 2001; 5:807-14.
21. McConkey SJ, Williams M, Weiss D, Adams H, Cave MD, Yang Z, et al. Prospective use of molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of restriction fragment-length polymorphism in a public tuberculosis-control program. *Clin Infect Dis* 2002; 34:612-9.
22. Chan-Yeung M, Tam CM, Wong H, Leung CC, Wang J, Yew WW. Molecular and Conventional Epidemiology of Tuberculosis in Hong Kong: a Population-Based Prospective Study. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2706-8.
23. Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valway S, Onorato IM, Castro KG. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* 1997; 175:1446-52.
24. Natal S, Valente JG, Sanches AR, Penna MLF. Isoniazid and rifampicin resistance and prior treatment for tuberculosis. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(5):1277-81.
25. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, et al. Transmission of tuberculosis in New York City an analysis by DNA fingerprint and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994; 17:1710-6.
26. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol* 1995; 8:180-99.
27. Ivens de Araújo ME, Fandinho FC, Werneck Barreto AM, Gonçalves Veloso V, Grinstejn B, Lourenço MK, et al. DNA fingerprint of *Mycobacterium tuberculosis* patients with and without AIDS in Rio de Janeiro. *Braz J Med Res* 1998; 31:369-72.
28. Lourenço MCS, Grinstejn B, Fandinho Montes FCO, Silva MG, Saad MHF, Fonseca LS. Genotypic patterns of multiple isolates of *M. tuberculosis* from tuberculous HIV patients. *Tropical Med and Intern Health* 2000; 5:488-94.
29. Baptista IMFD, Oelemann MC, Opromolla DVA, Suffys, PN. Drug Resistance and Genotypes of Strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Human Immunodeficiency Virus-infected and Non-infected Tuberculosis Patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:1147-52.