



2018
número
especial 10
2ª série

Doenças Infecciosas

Lisboa_INSA, IP

Nº especial _ Doenças Infecciosas

ISSN: 2183-8873 (em linha)

Observações

— Boletim Epidemiológico

sumário_

_ Editorial

Doenças infecciosas: novos desenvolvimentos na microbiologia p03

Infectious diseases: new developments in microbiology

Jorge Machado

_ Artigos breves

_ Investigação

1_ Nova abordagem genómica para a investigação da sífilis p04

Novel genomic approach to decode syphilis

Miguel Pinto, Vítor Borges, Minia Antelo, Miguel Pinheiro, Alexandra Nunes, Jacinta Azevedo, Maria José Borrego, Joana Mendonça, Dina Carpinteiro, Luís Vieira, João Paulo Gomes

_ Diagnóstico

2_ Novos flebovirus isolados em Portugal: importância e desafios para o diagnóstico clínico p08

New phleboviruses isolated in Portugal: importance and challenges for clinical diagnosis

Fátima Amaro, Líbia Zé-Zé, Maria João Alves

3_ Resistência de *Clostridium difficile* do ribotipo 017 ao imipenem: contributo da sequenciação do genoma completo p11

*Resistance of *Clostridium difficile* from ribotype 017 to imipenem: contribution of the whole genome sequencing*

Joana Isidro, Andrea Santos, Alexandra Nunes, Vítor Borges, Catarina Silva, Luís Vieira, Aristides L Mendes, Mónica Serrano, Adriano O Henriques, João Paulo Gomes, Mónica Oleastro

_ Vigilância laboratorial

4_ Nova era na vigilância da tuberculose multirresistente em Portugal: sequenciação do genoma completo p17

New era on the surveillance of multidrug resistant tuberculosis in Portugal: whole genome sequencing

Rita Macedo, Miguel Pinto, Vítor Borges, Alexandra Nunes, Joana Isidro, Sílvia Duarte, Luís Vieira, João Paulo Gomes

5_ Sequenciação de nova geração e efectividade da vacina anti-gripal: um estudo sobre o vírus da gripe A(H3), em doentes com síndrome gripal, épocas 2016/2017 e 2017/2018 p22

New generation sequencing and effectiveness of the influenza vaccine: a study on influenza A (H3) virus in patients with influenza, 2016/2017 and 2017/2018

Pedro Pechirra, Vítor Borges, Paula Cristóvão, Inês Costa, Patrícia Conde, Ausenda Machado, Ana Paula Rodrigues, Verónica Gomez, Irina Kislaya, Joana Mendonça, Baltazar Nunes, João Paulo Gomes, Raquel Guiomar

6_ Sequenciação do genoma completo como ferramenta da epidemiologia molecular: caracterização de estirpes de *Neisseria meningitidis* do serogrupo W isoladas em Portugal p29

*Whole genome sequencing as a tool for molecular epidemiology: characterization of *Neisseria meningitidis* serogroup W strains isolated in Portugal*

Célia Bettencourt, Alexandra Nunes, Maria João Simões

7_ Sequenciação de nova geração: o paradigma dos parasitas p34

New generation sequencing: the parasite paradigm

Anabela Vilares, Vítor Borges, Daniel Sampaio, Luís Vieira, Idalina Ferreira, Susana Martins, Tânia Reis, João Paulo Gomes, Maria João Gargaté

_ Plataforma de vigilância da gripe

8_ INSaFLU— uma plataforma bioinformática online para análise e comparação do genoma completo do vírus influenza: um contributo pioneiro para o reforço da vigilância da gripe à escala global p38

INSaFLU— an online bioinformatics platform for genome-scale analysis of influenza virus: an innovative contribution for the worldwide flu surveillance

Vítor Borges, Miguel Pinheiro, Pedro Pechirra, Raquel Guiomar, João Paulo Gomes



Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge

_Alimentação

9_ Sequenciação de estirpes de *Clostridium botulinum* tipo B isoladas em Portugal p41

Sequencing of Clostridium botulinum type B strains isolated in Portugal

Margarida Saraiva, Teresa Teixeira Lopes, António Castro, Cláudia Pena, Conceição Costa Bonito, Isabel Bastos Moura, Isabel Campos Cunha, Isabel Sousa, Maria Manuel Toscano, Maria Antónia Calhau

_Ambiente e infeção

10_ Biofilmes, micobactérias não tuberculosas e infeção p45

Biofilms, nontuberculous mycobacteria and infection

Maria Bandeira, Sigurd Wenner, Magda Ferreira, Patricia Almeida Carvalho, Luísa Jordão

Doenças infecciosas: novos desenvolvimentos na microbiologia

Infectious diseases: new developments in microbiology

Uma nova era da microbiologia iniciou-se quando foram introduzidas as técnicas de sequenciação de ácidos nucleicos uma vez que permitiram diagnósticos mais precisos (identificação de espécies e fatores de patogenicidade, toxinas e outros), o desenvolvimento da filogenia (comparabilidade entre estirpes) e um melhor conhecimento das causas de algumas alterações fenotípicas (identificação das mutações).

Após a introdução e evolução de metodologias de *Next-Generation Sequencing* (NGS) aplicada à extração total dos ácidos nucleicos a partir de uma amostra, uma nova revolução está em marcha, permitindo ainda uma maior precisão nas áreas anteriores e o desenvolvimento da disciplina de análise bioinformática de sequências. Com a aplicação de técnicas de NGS (*shotgun genomics*, *shotgun metagenomics*, *targeted metagenomics* e *metatranscriptomics*) desenvolveu-se o acesso ao pangenoma e ao core genoma, aos genes e às respetivas funções de uma forma mais completa, à composição filogenética de uma forma mais aprofundada, aumentando também o acesso ao conhecimento da atividade microbiana.

Estes novos desenvolvimentos possibilitam igualmente novas abordagens de análise bioinformática trabalhando-se cada vez mais de uma forma integrada e com recurso a uma grande troca de informações potenciada pelo incremento do aparecimento das plataformas bioinformáticas que permitem uma maior comparabilidade, novas funcionalidades e um trabalho cada vez mais global.

Os artigos que este número do *Boletim Epidemiológico Observações* incorpora são bem o exemplo de alguns dos avanços que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge tem efetuado na área da investigação aplicada às doenças infecciosas permitindo:

- um cada vez melhor diagnóstico laboratorial;
- uma vigilância das estirpes que circulam em Portugal, possibilitando uma melhor vigilância epidemiológica laboratorial;
- a deteção de “clusters” de estirpes (base para uma investigação epidemiológica) permitindo a identificação de surtos;
- a existência de colaborações com investigadores, grupos e instituições portuguesas e europeias que tornaram possíveis o desenvolvimento de plataformas globais (com reconhecimento internacional - Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças e Organização Mundial da Saúde) em algumas doenças infecciosas.

Jorge Machado

Coordenador do Departamento de Doenças Infecciosas
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP

Nova abordagem genómica para a investigação da sífilis

Novel genomic approach to decode syphilis

Miguel Pinto¹, Vítor Borges¹, Minia Antelo¹, Miguel Pinheiro², Alexandra Nunes¹, Jacinta Azevedo³, Maria José Borrego⁴, Joana Mendonça⁵, Dina Carpinteiro⁵, Luís Vieira⁵, João Paulo Gomes¹

miguel.pinto@insa.min-saude.pt

(1) Núcleo de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Instituto de Biomedicina. Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

(3) Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis. Centro de Saúde da Lapa, Agrupamento de Centros de Saúde Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(4) Laboratório de Referência de Infecções Bacterianas Sexualmente Transmissíveis. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(5) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada pela bactéria *Treponema pallidum* e constitui um problema de saúde pública mundial, em parte devido à ausência de uma vacina para prevenção da sua transmissão. A investigação desta doença tem sido atrasada pela incapacidade histórica de cultivar *T. pallidum* *in vitro*, dificultando por exemplo o desenvolvimento de estudos genómicos. De facto, há uma grande lacuna no conhecimento da epidemiologia molecular deste agente patogénico, assim como da base molecular que medeia a patogénese da sífilis. No estudo aqui apresentado, foi possível implementar uma abordagem inovadora para capturar o genoma de *T. pallidum* no contexto de infeção humana, evitando-se, assim, a necessidade da cultura da bactéria em modelo animal. Esta estratégia permitiu estudar, pela primeira vez, como é que este agente patogénico vai alterando o seu genoma para se adaptar e sobreviver como agente infeccioso humano. Nomeadamente permitiu descodificar os principais mecanismos genéticos pelos quais a bactéria *T. pallidum* evade o sistema imunitário e se adapta ao Homem nesta complexa e multifásica doença. A aplicação desta estratégia inovadora de monitorização da interação Homem-bactéria poderá ser importante para o desenvolvimento de novas medidas profiláticas e/ou terapêuticas. Acresce que esta abordagem constitui também um ponto de viragem para o aperfeiçoamento de metodologias de diagnóstico e de epidemiologia molecular, o que permitirá aumentar o conhecimento da distribuição geográfica, das vias de transmissão e das propriedades de virulência deste agente patogénico para bem da saúde pública.

_Abstract

Syphilis, a sexually transmitted disease caused by the bacterium T. pallidum, remains a global problem with an estimated 6 million people infected each year, which is in part attributed to the absence of a vaccine to prevent infection and transmission. Despite its tremendous public health impact, research in syphilis has been considerable hampered due to the historical inability to culture T. pallidum in vitro, which has hampered, for instance, the acquisition of consistent genomic data. As such, there is a strong lack of knowledge on the molecular epidemiology of this important human pathogen as well as on the molecular mechanisms underlying syphilis pathogenesis. In the work presented here, we have bypassed the culture bottleneck by means of a targeted strategy never applied to uncultivable

bacterial human pathogens to directly capture whole-genome T. pallidum data in the context of human infection. This strategy allowed, for the first time, to understand how this pathogen shapes its genome towards adaptation and survival during syphilis. While this work demonstrates the exceptional power of monitoring the pathogen adaptability during human infection, it also provides critical data that may guide the development of novel treatments and prophylactic measures, such as a vaccine. In other perspective, it is anticipated that the implemented methodological approach constitutes a disruptive step towards the improvement of the current diagnostics and typing methodologies, which will enhance the knowledge on the geographic distribution of strains, its transmissibility and propensity to cause disease.

_Introdução

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível que constitui um problema de saúde pública a nível mundial, que tem sido parcialmente atribuído à ausência de uma vacina para prevenção da sua transmissão (1,2). A bactéria *Treponema pallidum* é o agente etiológico responsável pela sífilis, cujo quadro clínico manifesta-se por lesão no local de contacto (sífilis primária), lesões cutâneas típicas após disseminação na corrente sanguínea (sífilis secundária), bem como quadros clínicos mais preocupantes como sífilis terciária (através, essencialmente, da infeção do sistema nervoso central) ou doença congénita (1). A par da importância da sífilis em saúde pública, a incapacidade histórica de cultivar *T. pallidum* *in vitro* (a propagação laboratorial só é possível com o recurso à inoculação em coelho) tem atrasado a investigação neste campo dificultando, por exemplo, a elaboração de estudos

genómicos. De facto, há uma grande lacuna no conhecimento da epidemiologia molecular deste agente etiológico, patogénico do Homem, particularmente no que respeita à distribuição geográfica e potencial emergência de estirpes *T. pallidum* resistentes aos antibióticos.

Desconhece-se também a base molecular que medeia a patogénese da sífilis e que está na base das diferentes manifestações clínicas que esta doença apresenta. Por exemplo, permanece por esclarecer como é que a bactéria consegue evadir o sistema imunitário após a lesão primária, invadindo e persistindo na corrente sanguínea e também ultrapassar as barreiras hematoencefálica e placentária.

Apesar da sua grande fragilidade *ex vivo*, em 1998 um projeto pioneiro revelou pela primeira vez a sequência completa do genoma de *T. pallidum*, após a propagação laboratorial da bactéria em modelo animal (3). Quase duas décadas depois, o nosso conhecimento a nível genómico desta bactéria aparentou ter estagnado (apenas 5 outros genomas foram publicados neste período), contrastando de forma evidente com outras bactérias patogénicas para as quais se conhecem centenas ou milhares de sequências genómicas. Não obstante, estudos anteriores já mostravam que *T. pallidum* possuía um genoma pequeno (~1,1 Mb), bastante conservado, com dois antigénios principais a serem codificados por genes altamente variáveis, *arp* e *tprK*, devido à presença de motivos genéticos repetitivos variáveis e de regiões variáveis fruto de mecanismos de conversão génica, respetivamente (3-6).

Neste contexto, surgiu a necessidade de encontrar uma alternativa para capturar, sequenciar e estudar o genoma de *T. pallidum*, diretamente de amostras clínicas humanas, evitando a necessidade da cultura em modelo animal. Neste estudo, esse obstáculo foi ultrapassado, permitindo estudar, pela primeira vez, como é que este agente patogénico vai moldando o seu genoma para se adaptar e sobreviver no contexto da sífilis. Assim, foi possível descodificar ao nível genético o “braço-de-ferro” estabelecido entre a bactéria e o ser humano durante a doença, tendo sido identificados quais os mecanismos que a bactéria usa para se adaptar e assim sobreviver ao ataque do sistema imunitário do Homem.

_Objetivo

O presente estudo descreve a implementação de uma abordagem inovadora para capturar e sequenciar o genoma de *T. pallidum* no contexto da infeção humana. Os objetivos específicos foram: i) identificação dos principais fatores genéticos associados à capacidade de sobrevivência e persistência de *T. pallidum* durante a infeção; e, ii) caracterização genómica das estirpes de *T. pallidum* circulantes em Portugal.

_Material e métodos

Como ponto de partida utilizaram-se amostras de DNA total extraído de amostras clínicas enviadas pela Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Centro de Saúde da Lapa para o Laboratório de Referência de Infeções Bacterianas Sexualmente Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). De forma a capturar o genoma completo de *T. pallidum* diretamente de amostras clínicas, foram desenhadas a nível bioinformático e posteriormente sintetizadas cerca de 20000 sondas de RNA complementares ao genoma da bactéria (7). O DNA alvo foi de seguida capturado tirando partido de partículas magnéticas acopladas às sondas desenhadas, sendo subsequentemente sujeito à metodologia de sequenciação do genoma completo e a análise bioinformática detalhada.

_Resultados e discussão

A importância da identificação e avaliação dos fatores genéticos envolvidos na adaptação, sobrevivência e persistência de agentes bacterianos patogénicos no contexto de infeção humana é inequívoca. No entanto, no que diz respeito ao agente etiológico causador da sífilis, a impossibilidade de propagá-lo em laboratório tem impedido o desenvolvimento de estudos focados nessa avaliação.

Neste contexto, a abordagem disruptiva descrita neste estudo constitui um importante avanço científico para o conhecimento da sífilis, permitindo analisar não só a diversidade genética entre estirpes de *T. pallidum* que infetam diferentes doentes, mas também a diversidade da população bacteriana que infeta um único doente. Em particular, este estudo

permitiu revelar a existência de uma estirpe de *T. pallidum* epidémica em Portugal, o que não poderia ser detetado através das metodologias moleculares tradicionais usadas até à data. Estudos posteriores encontram perfis genéticos similares em múltiplos países à escala global, apontando que os casos de sífilis atuais são provavelmente causados por uma estirpe de perfil pandémico (8).

Observou-se que o polimorfismo genético entre as estirpes circulantes estava concentrado essencialmente em 13 genes (englobando cerca de 70% do polimorfismo entre estirpes colhidas de doentes diferentes) os quais terão um papel crucial na interação da bactéria com o Homem durante a sífilis. Mais importante, descobriu-se que este agente patogénico modifica o seu genoma durante o processo infeccioso, modificando o *status* “ON/OFF” de algumas proteínas potencialmente associadas à virulência, tais como proteínas membranares e proteínas associadas à motilidade. A geração e manutenção de diversidade genética durante o processo infeccioso (“intra-doente”) parece ser fundamental para que a bactéria *T. pallidum* persista no hospedeiro. Este fenómeno afeta particularmente o maior antigénio da bactéria (TpK), o qual revelou uma enorme e surpreendente diversidade (“inter- e intra-doente”), apresentando perfis genéticos no contexto da infeção humana diferentes daqueles previamente obtidos após propagação laboratorial em modelo animal. Esta observação suporta a hipótese de que o estudo genético deste agente patogénico durante o processo infeccioso no Homem é fundamental para a compreensão da sua capacidade de não ser reconhecido pelo sistema imunitário, invadir e persistir no sangue, e ultrapassar as barreiras hematoencefálica e placentária.

Finalmente, identificou-se que as estirpes circulantes possuem, não só mutações associadas à resistência à azitromicina (antibiótico de segunda linha para o tratamento da sífilis), bem como mutações nunca descritas até à data afetando uma proteína, cujos homólogos noutras bactérias estão associados à resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Esta proteína constitui, assim, um alvo importante de vigilância futura de uma potencial diminuição da suscetibilidade à penicilina (o antibiótico de primeira linha para o tratamento da sífilis). Este

estudo ilustra a potencialidade da captura de material genético diretamente de amostras clínicas, acoplada à sequenciação do genoma completo, no estudo de infeções bacterianas. A possibilidade de poder avaliar a população bacteriana que está efetivamente a circular no Homem durante o processo infeccioso abre as portas para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na adaptação e persistência dos agentes patogénicos.

Conclusão

Este estudo permitiu descodificar os principais mecanismos genéticos pelos quais a bactéria *T. pallidum* evade o sistema imunitário e se adapta ao Homem nesta complexa e multifásica doença.

A aplicação desta estratégia inovadora de monitorização da interação Homem-bactéria poderá ser importante para o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas e/ou profiláticas, tais como o desenvolvimento de uma vacina, na medida em que se conseguiu identificar os perfis antigénicos dominantes da bactéria no processo infeccioso. Noutra perspetiva, esta abordagem constitui também um ponto de viragem para o aperfeiçoamento de metodologias de diagnóstico e de epidemiologia molecular, o que permitirá aumentar o conhecimento da distribuição geográfica, das vias de transmissão e das propriedades de virulência deste agente patogénico para bem da saúde pública.

O INSA tem um curso um estudo focado em continuar esta importante linha de investigação, o qual foi recentemente financiado pela Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (https://www.escmid.org/profession_career/awards_grants/research_grants/awardees_2018/).

Dada a relevância do estudo do perfil genético de *T. pallidum* em amostras clínicas associadas aos diferentes locais anatómicos e estadios de sífilis, sublinha-se a importância do envio deste tipo de amostras para o Laboratório de Referência de Infeções Bacterianas Sexualmente Transmissíveis. A equipa do INSA está disponível para encetar as colaborações necessárias nesse sentido.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (EXPL/BIA-MIC/0309/2013). Agradece-se à Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Comentário resumido do artigo original publicado: Pinto M, Borges V, Antelo M, Pinheiro M, Nunes A, Azevedo J, Borrego MJ, Mendonça J, Carpinteiro D, Vieira L, Gomes JP. *Genome-scale analysis of the non-cultivable Treponema pallidum reveals extensive within-patient genetic variation*. Nat Microbiol. 2016 Oct 17;2:16190. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.190>

Referências bibliográficas:

- (1) Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):29-49. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360276/>
- (2) Cullen PA, Cameron CE. Progress towards an effective syphilis vaccine: the past, present and future. Expert Rev Vaccines. 2006;5(1):67-80.
- (3) Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science. 1998;281(5375):375-88. <http://science.sciencemag.org/content/281/5375/375.long>
- (4) Giacani L, Brandt SL, Puray-Chavez M, et al. Comparative investigation of the genomic regions involved in antigenic variation of the TprK antigen among treponemal species, subspecies, and strains. J Bacteriol. 2012;194(16):4208-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416249/>
- (5) Centurion-Lara A, LaFond RE, Hevner K, et al. Gene conversion: a mechanism for generation of heterogeneity in the tprK gene of *Treponema pallidum* during infection. Mol Microbiol. 2004;52(6):1579-96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04086.x>
- (6) Pillay A, Liu H, Chen CY, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies pallidum. Sex Transm Dis. 1998 Sep;25(8):408-14.
- (7) Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. Nat Biotechnol. 2009; 27(2):182-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663421/>
- (8) Arora N, Schuenemann VJ, Jäger G, et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. Nat Microbiol. 2016;2:16245. <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/134132/>

Novos flebovírus isolados em Portugal: importância e desafios para o diagnóstico clínico

New phleboviruses isolated in Portugal: importance and challenges for clinical diagnosis

Fátima Amaro, Líbia Zé-Zé, Maria João Alves

fatima.amaro@insa.min-saude.pt

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Águas de Moura, Portugal.

_Resumo

Os flebovírus (género *Phlebovirus*, família *Phenuiviridae*) são arbovírus transmitidos por flebótomos que na Eurásia e África se encontram agrupados em três serocomplexos - Naples, Salehabad e Sicilian - podendo ser responsáveis por síndromes febris ou doença do sistema nervoso central, como no caso de infeção pelo vírus Toscana (TOSV). Em Portugal o diagnóstico laboratorial de flebovírus é realizado no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) desde 2007. Dados obtidos em estudos retrospectivos demonstraram que os flebovírus são agentes patogénicos negligenciados no nosso país. Estudos entomológicos realizados no CEVDI resultaram no isolamento e na sequenciação completa de dois novos flebovírus: os vírus Arrabida e Alcube. Estes vírus pertencem a complexos diferentes, respetivamente Naples e Salehabad, e a sua patogenia está em estudo num projeto de investigação no CEVDI. O maior desafio perante uma suspeita clínica de infeção por flebovírus será atingir um grau significativo de perceção por parte da comunidade médica uma vez que o diagnóstico laboratorial confirmatório apenas muito raramente é solicitado ao laboratório de referência.

_Abstract

Phleboviruses (genus Phlebovirus, family Phenuiviridae) are arboviruses transmitted by sandflies, which, in the Old World, are grouped in three serocomplexes - Naples, Salehabad and Sicily. They are responsible for febrile syndromes or, in the case of Toscana virus (TOSV), for central nervous system disease. In Portugal, the laboratory diagnosis of phleboviruses is carried out at the Center for Vectors and Infectious Diseases Research Doutor Francisco Cambournac of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) since 2007. Entomological studies resulted in the isolation and whole genome sequencing of two new phleboviruses: Arrabida and Alcube viruses. These viruses belong to different serocomplexes, Naples and Salehabad, respectively and their pathogenesis is under study in a research project at CEVDI. The greatest challenge for the diagnosis of phleboviruses in our country will be to reach a significant degree of perception from the part of the medical community since a confirmatory laboratory diagnosis is not often requested to the reference laboratory.

_Introdução

Os flebovírus são arbovírus transmitidos por flebótomos que se encontram organizados, na Eurásia e África, em três espécies ou grupos antigénicos, nomeadamente os serocomplexos Naples, Salehabad e Sicilian (1). Os vírus Naples e Sicilian podem causar a chamada febre dos três dias ou de pappataci, com sintomatologia associada a dores retro-orbitais e mialgias ou um quadro clínico de infeção assintomática (2).

O vírus Toscana (TOSV, serocomplexo Naples) é reconhecido como uma das mais importantes causas de meningite asséptica que ocorre preferencialmente nos meses de verão e nos países mediterrânicos (3).

Os flebovírus possuem genoma trisegmentado de RNA (segmentos L [*Large*], M [*Medium*] e S [*Small*]). Estão reconhecidos vírus recombinantes dentro deste grupo, uma vez que em situação de co-infeção (no reservatório ou hospedeiro) os segmentos L e S costumam segregar em conjunto, podendo o segmento M ter uma origem distinta (4). Este fenómeno causa desafios ao diagnóstico molecular, uma vez que a maioria dos alvos usados localizam-se no segmento S, mais conservado geneticamente (5).

Clinicamente não existe um marcador que distinga o TOSV de outros arbovírus neurotrópicos. De igual forma não existem manifestações clínicas específicas da febre por flebótomos causadas pelos vírus Naples e Sicilian. O diagnóstico laboratorial baseado em métodos diretos ou indiretos é a única forma de identificar as infeções causadas por flebovírus. O diagnóstico laboratorial destes agentes patogénicos é realizado, desde 2007, no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA). Atualmente, o diagnóstico

é realizado por RT-PCR em tempo real para o TOSV, RT-PCR convencional para o género flebovírus e serologia para os vírus TOS, Sicilian, Cyprus (serocomplexo Sicilian) e Naples. Estudos retrospectivos demonstraram que o vírus TOSV e os flebovírus em geral são vírus cuja importância como agentes patogénicos requerem investigação clínica e laboratorial reforçada no nosso país (6-8).

_Objetivo

O trabalho de investigação no CEVDI tem resultado no estudo de casos de infeção por TOSV e na identificação de novos flebovírus. O objetivo deste trabalho foi dar a conhecer a existência de dois novos flebovírus em Portugal, alertando a comunidade científica para a sua importância clínica e desafios para a saúde pública

_Material e métodos

Em estudos entomológicos realizados pelo CEVDI/INSA em 2007 e 2008 no distrito de Setúbal procedeu-se à deteção de RNA viral de 3875 flebótomos organizados em 141 *pools*, à qual se seguiram tentativas de isolamento e sequenciação do genoma completo usando tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS, na sigla em inglês) como descrito anteriormente (9,10).

_Resultados

Detetou-se pela primeira vez em Portugal o flebovírus Massilia, serocomplexo Naples, e foram isolados dois novos flebovírus: vírus Arrabida e vírus Alcube (9,10).

Com base na análise filogenética das sequências do genoma completo dos três segmentos obtidos com sequenciação de nova geração, podemos concluir que o vírus Arrabida pertence ao serocomplexo Naples e está relacionado com os vírus Massilia (11), Granada (12) e Punique (13). A análise genética indica que o vírus Arrabida resultou de eventos de recombinação (9).

Através da análise filogenética do genoma completo do vírus Alcube (10) foi possível verificar que faz parte do serocomplexo Salehabad (14) e que forma uma linhagem monofilética com

este e ainda os vírus Arbia (15) e Adana (16), partilhando um ancestral comum (10). A análise dos três segmentos permitiu confirmar a ausência de inconsistências nos ramos sugerindo que não existem fenómenos de recombinação entre estes vírus.

_Discussão e conclusões

No serocomplexo Naples, até ao presente não existem provas que os vírus Massilia, Granada, Punique ou Arrabida sejam patogénicos para os seres humanos embora existam estudos de seroprevalência que demonstram que os vírus Granada e Punique podem ser infecciosos, em baixa prevalência, levando a casos assintomáticos (17,18).

No serocomplexo Salehabad não existem também provas de associação dos vírus Salehabad e Arbia a doença humana. Apesar de altas taxas de seroprevalência de vírus Adana, pertencente ao mesmo serocomplexo, terem sido encontradas em animais, como cabras, ovelhas e cães, na população humana foram identificadas taxas de seroprevalência baixas o que sugere que este não constituirá um problema de saúde pública (16). No entanto, já foi detetado RNA genómico de outro flebovírus, nomeadamente Adria, pertencente ao mesmo serocomplexo, numa criança com síndrome febril e convulsões, o que sugere a sua patogenia (19).

O acesso a tecnologias de sequenciação de nova geração, permitiu, nos últimos anos, a descrição de novos vírus. A somar aos flebovírus com capacidade patogénica reconhecida, identificaram-se agora novos flebovírus cuja capacidade de causar doença não pode ser excluída uma vez que não existem estudos suficientes sobre essa possibilidade. Como exemplos do passado temos os vírus TOS e Adria isolados inicialmente em flebótomos que aparentemente não eram patogénicos e cuja patogenia foi provada mais tarde.

Apesar do papel importante do TOSV em infeções do sistema nervoso central e da emergência de novos flebovírus, estes permanecem negligenciados e raramente são considerados pelos clínicos nos algoritmos de diagnóstico no nosso país.

A importância em termos de saúde pública dos vírus Arrabida e Alcube é, neste momento, objeto de um projeto de investi-

artigos breves_ n. 2

gação que decorre no CEVD/INSA e que irá contribuir para clarificar a importância e desafios do diagnóstico clínico e laboratorial dos flebovírus em Portugal.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do projeto Flebovírus em Portugal: vetores, patogénese e co-infecções (PTDC/DTP-SAP/0859/2014). Agradece-se à Doutora Cristina Furtado a revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Alwassouf S, Christodoulou V, Bichaud L, et al. Seroprevalence of Sandfly-Borne Phleboviruses Belonging to Three Serocomplexes (Sandfly fever Naples, Sandfly fever Sicilian and Salehabad) in Dogs from Greece and Cyprus Using Neutralization Test. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(10):e0005063. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081206/>
- (2) Sabin AB, Philip CB, Paul JR. Phlebotomus (pappataci or sandfly) fever: a disease of military importance; summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. *JAMA.* 1944; 125(9): 603-6 and 693-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01330.x>
- (3) Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005 Nov;11(11):1657-63. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367371/>
- (4) Briese T, Calisher CH, Higgs S. Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology.* 2013;446(1-2):207-16. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.030>
- (5) Collao X, Palacios G, Sanbonmatsu-Gámez S, et al. Genetic diversity of Toscana virus. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):574-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671431/>
- (6) Amaro F, Luz T, Parreira P, et al. Vírus Toscana na população portuguesa. Vigilância sero-epidemiológica e casos clínicos. *Acta Med Port* 2011; 24(S2): 503-8. <https://actamedicportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/download/1443/1031>
- (7) Amaro F, Luz T, Parreira P, et al. Serological evidence of Toscana virus infection in Portuguese patients. *Epidemiol Infect.* 2012;140(6):1147-50. Epub 2011 Jul 29.
- (8) Amaro F, Líbia Zê-Zê, Luz MT, et al. Vírus Toscana: um vírus emergente transmitido por flebotomos negligenciado em Portugal. V Congresso Nacional de Virologia/IX Encontro da Sociedade Portuguesa de Virologia, Porto, Portugal, 27-28 out. 2018 (R10). https://spv.pt/5CNVirologia/wp-content/uploads/2018/10/livroresumos_5CNV.pdf
- (9) Amaro F, Hanke D, Zê-Zê L, et al. Genetic characterization of Arrabida virus, a novel phlebovirus isolated in South Portugal. *Virus Res.* 2016;214:19-25.
- (10) Amaro F, Zê-Zê L, Alves MJ, et al. Co-circulation of a novel phlebovirus and Massilia virus in sandflies, Portugal. *Virol J.* 2015;12:174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619550/>
- (11) Charrel RN, Moureau G, Temmam S, et al. Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9(5):519-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2976643/>
- (12) Collao X, Palacios G, de Ory F, et al. Granada virus: a natural phlebovirus reassortant of the sandfly fever Naples serocomplex with low seroprevalence in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(4):760-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946739/>
- (13) Zhioua E, Moureau G, Chelbi I, et al. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 5):1275-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3496376/>
- (14) Palacios G, Savji N, Travassos da Rosa A, et al. Characterization of the Salehabad virus species complex of the genus Phlebovirus (Bunyaviridae). *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 4):837-42. Epub 2012 Dec 12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709685/>
- (15) Verani P, Ciufolini MG, Cacioli S, et al. Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterized of a new Phlebovirus (Arabia virus). *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(2):433-9.
- (16) Alkan C, Alwassouf S, Piorkowski G, et al. Isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Adana virus, a novel phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex, in Turkey. *J Virol.* 2015 Apr;89(8):4080-91. doi: 10.1128/JVI.03027-14. Epub 2015 Feb 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442372/>
- (17) Navarro-Marí JM, Gómez-Camarasa C, Pérez-Ruiz M, et al. Clinic-epidemiologic study of human infection by Granada virus, a new phlebovirus within the sandfly fever Naples serocomplex. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(5):1003-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3752739/>
- (18) Sakhria S, Bichaud L, Mensi M, et al. Co-circulation of Toscana virus and Punique virus in northern Tunisia: a microneutralisation-based seroprevalence study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(9):e2429. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772032/>
- (19) Anagnostou V, Pardalos G, Athanasiou-Metaxa M, et al. Novel phlebovirus in febrile child, Greece. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):940-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321796/>

Resistência de *Clostridium difficile* do ribotipo 017 ao imipenemo: contributo da sequenciação do genoma completo

Resistance of *Clostridium difficile* from ribotype 017 to imipenem: contribution of the whole genome sequencing

Joana Isidro¹, Andrea Santos¹, Alexandra Nunes², Vítor Borges², Catarina Silva³, Luís Vieira³, Aristides L Mendes⁴, Mónica Serrano⁴, Adriano O. Henriques⁴, João Paulo Gomes², Mónica Oleastro¹

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência das Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Núcleo de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(4) Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade NOVA de Lisboa, Oeiras, Portugal.

_Resumo

A infeção por *Clostridium difficile* é a principal causa de diarreia infecciosa associada aos cuidados de saúde. Neste estudo, caracterizámos um conjunto de estirpes clínicas de *Clostridium difficile*, provenientes de diversos hospitais portugueses, com o objetivo de estudar a resistência aos carbapenemos neste agente patogénico. Um total de 191 estirpes clínicas, isoladas entre 2012 e 2015 de 15 hospitais em Portugal, foram incluídas no estudo; a suscetibilidade ao imipenemo foi determinada por um método de gradiente de difusão em agar. Foram selecionadas estirpes sensíveis e resistentes ao imipenemo, para estudos fenotípicos adicionais e para contributo da sequenciação do genoma completo. A resistência ao imipenemo foi detetada em 24 (12,6%) das estirpes, 22 das quais pertencentes ao ribotipo (RT) 017 (apenas toxina B positivo), todas provenientes do mesmo hospital, durante o período em estudo, e com perfil de multiresistência. Pela análise dos dados de sequenciação dos genomas, foram identificadas duas substituições de aminoácidos (Ala555Thr e Tyr721Ser) nos domínios funcionais de duas enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano (*penicillin-binding proteins* - PBP). Uma PBP adicional foi também identificada nas estirpes RT017. Este estudo descreve pela primeira vez alterações em PBPs como base genética provável da resistência ao imipenemo em *C. difficile*.

_Abstract

Clostridium difficile is a major cause of healthcare-associated infections. Here, we characterized *C. difficile* strains isolated in Portuguese hospitals, in order to search for imipenem resistance and the underlying genetic determinants. Imipenem susceptibility testing by agar gradient diffusion was performed on 191 *C. difficile* strains, isolated from 15 Portuguese hospitals, between 2012-2015. Some of the imipenem-resistant and imipenem-susceptible strains were selected for downstream phenotypic analyses and for whole genome sequencing (WGS). Resistance to imipenem was detected in 24 (12.6 %) strains, 22 of which were ribotype (RT) 017 strains, only positive for toxin B, isolated in the same hospital, and presenting resistance to several other antibiotics. Through analysis of WGS data, two amino acid changes (Ala555Thr and Tyr721Ser) targeting the transpeptidase domain of two penicillin-binding proteins (PBP) were identified. An additional PBP was also identified in this ribotype. We describe, for the first time, mutations in PBP-encoding genes as the probable genetic basis for *C. difficile* imipenem resistance.

_Introdução

Clostridium difficile, recentemente renomeado *Clostridioides difficile*, é um bacilo de Gram-positivo, formador de esporos e produtor de toxinas, constituindo a principal causa de diarreia em doentes internados associada ao consumo de antibióticos nos países desenvolvidos (1). A infeção por *C. difficile* (ICD) resulta da ação de duas toxinas, A e B (TcdA e TcdB), sendo que algumas estirpes de *C. difficile* produzem uma toxina adicional, a toxina binária CDT (*C. difficile transferase*) (2).

Os sintomas da ICD variam entre um quadro leve de diarreia até ao desenvolvimento de colite pseudomembranosa, potencialmente letal, constituindo fatores de risco, entre outros, hospitalizações recentes e antibioterapia prévia (3). Os antibióticos causam desequilíbrio na flora protetora intestinal, permitindo que os esporos de *C. difficile* germinem no colón, e também conferem uma vantagem seletiva para o desenvolvimento de estirpes infetantes de *C. difficile* resistentes (4). Múltiplos antibióticos podem contribuir para promover a ICD, no entanto o maior risco tem sido associado ao consumo de cefalosporinas e fluoroquinolonas (4). A resistência a múltiplos antibióticos tem sido frequentemente encontrada em estirpes epidémicas de *C. difficile*, sendo frequente a localização dos determinantes de resistência em elementos genéticos que podem ser transferidos de forma horizontal (*horizontal gene transfer* - HGT) entre as bactérias (5). De facto, nas últimas décadas, a ICD tem sido mais descrita em situações associadas a surtos do que a casos esporádicos, com consequências mais negativas quanto à

severidade e letalidade da doença (6). Esta constatação foi explicada sobretudo pela disseminação de estirpes *C. difficile* resistentes às fluoroquinolonas, pertencentes ao ribotipo (RT) 027 e responsáveis por surtos em meio hospitalar em todo o mundo (7). Mais recentemente, estirpes de outros ribotipos de *C. difficile*, como RT078 e RT017, têm mostrado uma virulência aumentada e têm emergido em diversas regiões (8). O RT017, com fenótipo toxina A-negativo e toxina B-positivo, é o ribotipo mais frequente na Ásia e em alguns países da Europa de leste (8).

O imipenemo, pertencente à classe dos carbapenemos, é atualmente o antibiótico de última linha para o tratamento de infeções por bactérias de Gram-negativo. Num estudo recente, multicêntrico e europeu, que analisou mais de 900 estirpes de *C. difficile*, foi obtida uma proporção de resistência ao imipenemo de 7,4%, com uma média geométrica para a concentração mínima inibitória (CMI) de 5.91 mg/L em estirpes de *C. difficile* do RT017 (9).

_Objetivo

Neste estudo caracteriza-se um conjunto de estirpes clínicas de *Clostridium difficile*, provenientes de diversos hospitais portugueses, com o objetivo de estudar a resistência aos carbapenemos neste agente patogénico.

_Material e métodos

Entre setembro de 2012 e setembro de 2015 foram estudadas no Laboratório Nacional de Referência das Infeções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) estirpes de *C. difficile* isoladas de 191 doentes e provenientes de 15 hospitais em Portugal.

Os métodos laboratoriais relativos ao estudo da suscetibilidade aos antibióticos e sequenciação de nova geração encontram-se detalhados no material suplementar do artigo original (10).

_Resultados e discussão

Das 191 estirpes de *C. difficile* estudadas entre setembro 2012-2015 e provenientes de 15 hospitais nacionais, 24 (12,6%) foram resistentes ao imipenemo. Destas, 22 estirpes foram do RT017, uma do RT014 e a restante do RT477.

Para as 22 estirpes imipenemo-resistentes do RT017, a CMI determinada foi >32 mg/L (tabela 1), enquanto que para as duas estirpes não-RT017 a CMI foi de 16 mg/L. Os 22 isolados RT017 resistentes ao imipenemo foram provenientes de um hospital ao longo dos 3 anos do estudo, o que sugeriu a presença de um clone persistente nesta unidade hospitalar, de acordo também com os dados obtidos pela contribuição da sequenciação do genoma completo (*Whole Genome Sequencing* – WGS) (Hospital A, tabela 1, figura 1). De entre as 191 estirpes estudadas, foram identificadas outras três do RT017 sensíveis ao imipenemo provenientes de um outro hospital (Hospital B, tabela 1) e cujos genomas foram comparados com os das 22 estirpes RT017 imipenemo-resistentes.

Os 22 isolados RT017 resistentes ao imipenemo foram também resistentes aos antibióticos clindamicina, eritromicina, moxifloxacina, tetraciclina e rifampicina, corroborando os resultados já descritos em outros estudos (9); os três isolados RT017 sensíveis ao imipenemo apresentaram o mesmo padrão de resistência aos antibióticos em apreciação, exceto à moxifloxacina. A CMI para o meropenemo e ertapenemo foi superior para os isolados resistentes ao imipenemo (tabela 1).

Pela análise dos dados de WGS, a multiresistência aos antibióticos não carbapenemos foi associada à presença de vários determinantes de resistência, muitos deles localizados em elementos genéticos móveis (figura 2), o que confirma que a HGT desempenha um papel major na evolução deste agente patogénico (11).

A análise dos dados de WGS mostrou também que os 25 isolados do RT017 formam dois grupos geneticamente distintos, de acordo com o hospital de origem (figura 1). De entre as mutações pontuais que distinguiam ambos os

Tabela 1: Suscetibilidade a 11 antibióticos de estirpes de *Clostridium difficile* RT017: 22 resistentes (Hospital A) e 3 sensíveis (Hospital B) ao imipenemo, setembro 2012-2015.

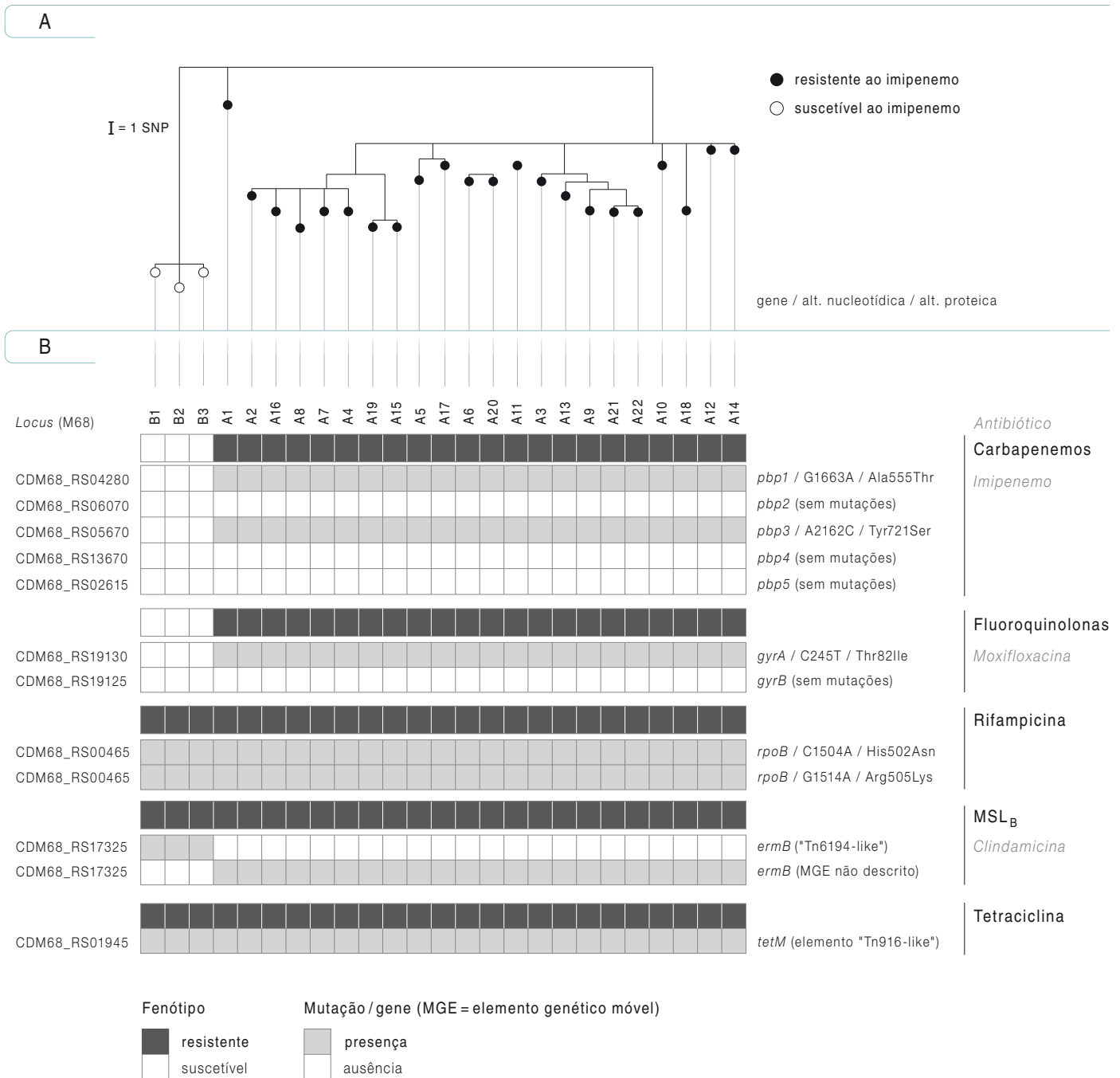
		IMP**	ETP**	MRP**	MXF*†	MTZ*†	VAN*†	CLI**	CHL**	RIF*	TGC*	TET**
cut-off R*		≥16	≥16	≥16	>4	>2	>2	≥8	≥32	>0,004	>0,25	≥16
Hospital A (n=22)	Intervalo CMI	>32	3-16	1.5-4	>32	<0.016-1	0.38-2	>256	2-6	>32	<0.016-0.094	16-32
	MG CMI	32	7.56	2.31	32	0.12	0.73	256	3.29	32	0.025	18.08
	CMI ₉₀	32	12	3	>32	0.38	2	256	4	32	0.032	32
	CMI ₅₀	32	6	2	>32	0.19	0.75	256	3	32	0.023	16
	% R	100	4,5	0	100	0	0	100	0	100	0	100
Hospital B (n=3)	Intervalo CMI	1.5-3	1.5-2	0.5-1.5	1.5	<0.016-0.25	0.38-0.75	>256	3-4	>32	<0.016-0.023	16
	MG CMI	2.08	1.82	0.83	1.5	0.072	0.60	256	3.30	32	0.020	16
	CMI ₉₀	3	2	1.5	1.5	0.25	0.75	256	4	32	0.023	16
	CMI ₅₀	2	2	0.75	1.5	0.094	0.75	256	3	32	0.023	16
	% R	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100
P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.45	0.56	-	0.98	-	0.41	0.51

IMP=imipenemo ETP=ertapenemo MRP=meropenemo MXF=moxifloxacina MTZ=metronidazol VAN=vancomicina CLI=clindamicina CHL=cloranfenicol RIF=rifampicina TGC=tigeciclina R=resistente CMI=concentração mínima inibitória MG=média geométrica; Valores da CMI em mg/L. *EUCAST **CLSI † Determinado anteriormente (12).

grupos, foram identificadas duas em genes que codificam para duas *penicillin binding proteins* (PBPs) de alto peso molecular (*high molecular weight* – HMW). (figura 2). As HMW PBPs são divididas em enzimas de classe A, bifuncionais contendo os domínios transglicosilase (TGase) e transpeptidase (TPase), e de classe B, que não possuem o domínio TGase. O domínio TPase possui três motivos funcionais, SxxK, SxN e KTG[T/S], que compõem o seu sítio ativo. Os carbapenemos bloqueiam a síntese da parede celular por inibição da atividade TPase (13). Uma das mutações foi identificada no gene codificante da PBP1, a única enzima bifuncional implicada na síntese do peptidoglicano em *C. difficile*; esta mutação resultou na substituição de aminoácidos Ala555Thr, localizada próximo do motivo funcional SSN (figura 2). A segunda mutação foi identificada no gene codificante da PBP3, uma TPase de classe B, causando a substituição de aminoácidos Tyr721Ser, entre os motivos funcionais SxN e KTGT (figura 2). As duas estirpes não pertencem

centes ao RT017, a saber as estirpes RT014 e RT477 com CMI inferior ao clone RT017 resistente, apresentaram a substituição Ala555Thr ou outra alteração também perto do motivo funcional SxN (Leu543His), ambas na PBP1. PBPs modificadas com afinidade reduzida para o antibiótico têm sido associadas à resistência aos β-lactâmicos e especificamente ao imipenemo em diferentes microrganismos (13). Não foram encontradas diferenças entre as estirpes resistentes e sensíveis para as restantes HMW PBPs (figura 2). No entanto, todas as 25 estirpes do RT017 do presente estudo, bem como estirpes do RT017 com genoma anotado, estirpe M68 (nº acesso NC_017175) e BJ08 (nº acesso CP003939), apresentaram uma HMW PBP de classe B adicional (PBP5), localizada num elemento móvel nos genomas estudados e anotados, e ausente noutros RTs. Estudos adicionais são necessários para perceber se a PBP5 contribui para a resistência ao imipenemo em *C. difficile* do RT017.

Figura 1: ↓ Filogenia de estirpes de *Clostridium difficile* RT017 e determinantes genéticos de resistência aos antibióticos.



A) Análise do genoma partilhado (*core-genome SNP-based Neighbour-joining*) de 25 isolados de *Clostridium difficile* RT017. Cada isolado está marcado de acordo com seu perfil de suscetibilidade ao imipenemo. **B)** para cada isolado o perfil de suscetibilidade a cada antibiótico é indicado juntamente com o respetivo determinante genético de resistência. A identificação dos genes (CDM68_RS) é relativa ao genoma anotado da estirpe *C. difficile* M68.

_Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que a resistência ao imipenemo em estirpes de *C. difficile* RT017 envolveu a aquisição de mutações nos genes *pbp1* e *pbp3*, que resultam na alteração de aminoácidos perto do motivo TPase das respetivas enzimas. Estas substituições podem levar à diminuição da afinidade das PBP1 e PBP3 para o imipenemo, permitindo a síntese do peptidoglicano mesmo na presença do antibiótico. Como a presença de uma PBP5 adicional é uma característica deste ribotipo, este estudo sugere que a PBP5 possa facilitar a expressão da resistência ao imipenemo através da aquisição de mutações nos genes *pbp1* e *pbp3*. Em estirpes de outros ribotipos que não possuem a PBP5, tais como as duas estirpes dos RT014 e RT477 descritas neste estudo, a mutação na *pbp1* poderá originar apenas um nível de resistência intermédio. Assim, é provável que a disseminação do gene *pbp5* possa contribuir para a disseminação de alto nível de resistência ao imipenemo.

Portugal tem das mais elevadas taxas de infeções associadas aos cuidados de saúde e consumo de carbapenemos na Europa ⁽¹⁾. Embora não seja possível associar diretamente o padrão de consumo de carbapenemos ao padrão de resistência em *C. difficile*, alerta-se que o aparecimento de resistência e/ou suscetibilidade reduzida a estes antibióticos pode recapitular o cenário observado com o clone de *C. difficile* RT027 resistente a fluoroquinolonas, quando estas foram o antibiótico mais prescrito nos Estados Unidos da América ⁽¹⁴⁾. Este estudo reforça também a necessidade de uma utilização adequada dos antibióticos em Portugal, face à emergência de resistências aos carbapenemos em clones de *C. difficile*, já de si multirresistentes, o que pode contribuir para a sua disseminação. Finalmente, este estudo evidencia a utilidade de WGS para identificação de novos determinantes de resistência aos antibióticos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo INSA (projeto 2016DDI1284) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (bolsa de investigação no âmbito do projeto Pest-C/EQB/LA0006/2011; programa IF IF/00268/2013/CP1173/CT0006, a MS; bolsa de doutoramento PD/BD/105738/2014, a ALM). Agradece-se aos hospitais partici-

pantes por cederem amostras para a vigilância laboratorial da infeção por *Clostridium difficile*; à Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Este artigo é uma tradução abreviada da publicação:

Isidro J, Santos A, Nunes A, Borges V, Silva C, Vieira L, Mendes AL, Serrano M, Henriques AO, Gomes JP, Oleastro M. *Imipenem Resistance in Clostridium difficile Ribotype 017, Portugal*. Emerg Infect Dis. 2018;24(4):741-745.

<https://dx.doi.org/10.3201/eid2404.170095>

Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals, 2011-2012. Stockholm: ECDC, 2013. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>
- (2) Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(6):723-50. doi: 10.1093/femsre/flux048. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904847/>
- (3) Smits WK, Lyras D, Lacy DB, et al. *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45453186/>
- (4) Slimings C, Riley TV. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2014;69(4):881-91. Epub 2013 Dec 8.
- (5) Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. Ther Adv Infect Dis. 2016;3(1):23-42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735502/>
- (6) Gerding DN, Lessa FC. The epidemiology of *Clostridium difficile* infection inside and outside health care institutions. Infect Dis Clin North Am. 2015;29(1):37-50.
- (7) Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):529-49. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20610822/>
- (8) King AM, Mackin KE, Lyras D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. Future Microbiol. 2015;10(1):1-4.
- (9) Freeman J, Vernon J, Morris K, et al.; Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes' Study Group. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. Clin Microbiol Infect. 2015;21(3):248.e9-248.e16. Epub 2014 Oct 13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.09.017>
- (10) Isidro J, Santos A, Nunes A, et al. Imipenem Resistance in *Clostridium difficile* Ribotype 017, Portugal. Emerg Infect Dis. 2018;24(4):741-745. <https://doi.org/10.3201/eid2404.170095>
- (11) He M, Sebailia M, Lawley TD, et al. Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(16):7527-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2867753/>
- (12) Santos A, Isidro J, Silva C, et al. Molecular and epidemiologic study of *Clostridium difficile* reveals unusual heterogeneity in clinical strains circulating in different regions in Portugal. Clin Microbiol Infect. 2016;22(8):695-700. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.002>
- (13) Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. FEMS Microbiol Rev. 2008;32(2):361-85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>
- (14) He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. Nat Genet. 2013;45(1):109-13. Epub 2012 Dec 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3605770/>

Nova era na vigilância da tuberculose multirresistente em Portugal: sequenciação do genoma completo

New era on the surveillance of multidrug resistant tuberculosis in Portugal: whole genome sequencing

Rita Macedo¹, Miguel Pinto², Vítor Borges², Alexandra Nunes², Joana Isidro², Sílvia Duarte³, Luís Vieira^{3,4}, João Paulo Gomes²

rita.macedo@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para as Micobactérias. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Núcleo de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Unidade de Tecnologia e Inovação, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(4) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana (ToxOmics), Genética, Oncologia e Toxicologia Humana da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

_Resumo

A tuberculose multirresistente continua a ser um dos principais desafios no controlo da Tuberculose em Portugal. Os métodos de diagnóstico e vigilância clássicos são trabalhosos, muito demorados e nem sempre fáceis de interpretar. A introdução de metodologias moleculares permitiu ultrapassar alguns destes obstáculos, mas, sendo limitada no número de alvos genéticos que analisa, não permite uma análise completa das características das estirpes de *M. tuberculosis* isoladas. Para ultrapassar esta questão, tivemos como objectivo a implementação de uma metodologia baseada na sequenciação total do genoma que, para além de permitir um *screening* de todas as mutações conhecidas associadas a resistência, permite fazer uma vigilância molecular das estirpes com uma sensibilidade muito elevada, possibilitando a intervenção das Autoridades de Saúde de forma atempada e otimizada. O Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias/Tuberculose do Instituto Nacional de Doutor Ricardo Jorge está, neste momento, capacitado para responder eficazmente a estas necessidades garantindo um diagnóstico e vigilância em "tempo real" de todas as estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes.

_Abstract

*Multidrug-resistant tuberculosis continues to be one of the main challenges for Tuberculosis' control in Portugal. Classical diagnostic and surveillance methods are laborious, time-consuming and not always easy to interpret and perform. The introduction of molecular methodologies overcame some of these obstacles, but, as they are limited in the number of genetic targets analyzed, they do not allow a complete analysis of the characteristics of the isolated *M. tuberculosis* strains. As such, we aimed to implement a methodology based on whole genome sequencing that, in addition to enable the screening of all known mutations associated with resistance, it makes it possible to carry out molecular surveillance of the strains with a very high sensitivity, allowing a timely and optimized intervention of the Health Authorities. The National Reference Laboratory of Mycobacteria / Tuberculosis is now capable of responding effectively to these needs, ensuring a "real time" diagnosis and surveillance of all multidrug resistant *M. tuberculosis* strains.*

_Introdução

A Tuberculose (TB) continua a ser uma das principais causas de morte por doença infecciosa em todo o Mundo (1,2). Em 2017, 10.4 milhões de pessoas adoeceram, 1.7 milhões morreram da doença e, embora a incidência de TB tenha vindo a decrescer cerca de 2% por ano, o problema da resistência aos antibióticos e, em particular, da multirresistência, desafia o cumprimento das metas de erradicação previstas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para 2030 (1). Com 460 mil casos (~5% do total de casos diagnosticados) em 2017 causados por estirpes de TB multirresistente (TB-MR, ou seja, resistentes a rifampicina e isoniazida), das quais, 8,5% são também extensivamente resistentes (TB-XDR; isto é, TB-MR com resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e amicacina/canamicina ou capreomicina) e considerando que a transmissão pessoa-a-pessoa é a principal via de contágio, a monitorização e controlo destes casos é fundamental para um programa de controlo de TB ter sucesso (2). Em Portugal, a incidência de TB tem também vindo a diminuir nos últimos anos, com uma média de decréscimo de cerca de 5% ao ano (3). De 2013 a 2017, cerca de 10.000 novos casos de TB foram notificados à Direção-Geral da Saúde (DGS) e a proporção de doentes com TB-MR permaneceu estável, correspondendo a 1% do total de casos diagnosticados (3,4).

Tendo em consideração que a maioria das mortes por TB pode ser minimizada através do diagnóstico precoce e tratamento adequado, a OMS propôs, em 2015, a expansão do diagnóstico laboratorial rápido como uma das cinco prioridades para combater a crise global de casos de TB resistente aos

antibacilares (1). Os testes fenotípicos, usando métodos convencionais, podem levar até oito semanas para o isolamento e identificação das estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e duas a quatro semanas adicionais até que o perfil de resistência aos antibacilares seja conclusivo (5). Obviamente, a introdução de ferramentas de diagnóstico molecular para a detecção de resistência permite acelerar o diagnóstico da TB-M/XDR, evitando a disseminação da doença e permitindo opções terapêuticas dirigidas. Actualmente, existem já inúmeros testes moleculares que permitem a detecção rápida de mutações, mas o número de alvos genéticos pesquisados é muito limitado. Por outro lado, as intervenções direcionadas para interromper cadeias de transmissão exigem um conhecimento epidemiológico exaustivo e fundamentado que só pode ser conseguido aliando a informação genética à informação resultante da investigação epidemiológica. Por estes motivos, têm sido inúmeros os desenvolvimentos laboratoriais na área da vigilância molecular da TB e, actualmente, a sequenciação do genoma completo (*whole genome sequencing* - WGS) tem o potencial para se tornar a ferramenta de eleição para a genotipagem das estirpes do complexo MTC (6-9), fornecendo informações genéticas abrangentes, incluindo todos os possíveis alvos genéticos que podem dar informações rápidas sobre a resistência aos antibacilares e virulência das estirpes MTC (6,10-12). Para além disso, estão a ser desenvolvidos esforços no sentido de permitir aplicar métodos baseados em WGS diretamente a partir da amostra clínica, passando-se assim das 8 semanas necessárias ao crescimento das estirpes de MTC, para um conhecimento genómico completo da mesma em menos de uma semana após colheita do produto biológico (13).

Desde 2014 que, em Portugal, existem centros específicos para o diagnóstico, consultoria, acompanhamento e tratamento dos casos de TB-M/XDR. Estes centros permitem agilizar a ligação entre a investigação epidemiológica realizada pelas Autoridades de Saúde Pública e os dados laboratoriais que são obtidos de forma sistemática pelo Laboratório Nacional de Referência de Tuberculose (LNR-TB) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Dado que o LNR-TB recebe as estirpes isoladas de todos os doentes com TB-MR

diagnosticada em Portugal (obrigatório desde 2007) (14), é de extrema importância definir um sistema de genotipagem molecular centralizado e robusto que mais rapidamente estabeleça a associação entre os dados genéticos e epidemiológicos, tendo em vista a deteção e monitorização em “tempo real” dos perfis de resistência e possíveis cadeias de transmissão.

_Objetivo

O presente estudo descreve a implementação de uma abordagem baseada em WGS, para a vigilância da TB e deteção de mutações associadas à resistência aos antibacilares, através da avaliação retrospectiva de todas as estirpes de TB-M/XDR isoladas nos últimos 5 anos em Portugal.

_Materiais e métodos

Do total das cerca de 10.000 estirpes de MTC isoladas em Portugal entre 2013 e 2017, 96 eram casos de TB-M/XDR. Destas, 83 (86,5%) estavam disponíveis para análise sendo que os restantes casos foram diagnosticados apenas por biologia molecular não tendo havido isolamento da estirpe. Os testes de sensibilidade aos antibacilares (1ª e 2ª linha: Isoniazida, Rifampicina, Estreptomina, Etambutol, Pirazinamida, Etionamida, Fluoroquinolonas, Canamicina, Amicacina, Linezolide, Cicloserina e PAS) e a genotipagem pelo método tradicional, *Mycobacterium Interspersed Repetitive Units* (MIRU-VNTR) foram efetuados de acordo com as indicações do fabricante. A metodologia de WGS foi realizada como descrito num estudo nosso recentemente publicado (12). Para a extração *in silico* dos perfis genéticos de resistência foi utilizado o *software* bioinformático TB profiler v0.3.0 (12,15). A análise bioinformática usada para a vigilância com base em WGS assenta numa abordagem gene-a-gene (*multilocus sequence typing*) que tira partido de um conjunto de 3656 genes de MTC (7,8) e utiliza os *softwares* de utilização livre chewBBACA (16) e PHYLOViZ disponíveis online (17).

Dado que o estabelecimento de valores de *cutoff* para proximidade genética é ainda um assunto em investigação, optámos por uma abordagem de *cutoff* relativa, a qual tem em conta o número de diferenças genéticas para um deter-

artigos breves_ n. 4

minado denominador (i.e., número de genes em análise). Por outro lado, este é um processo dinâmico pois o próprio conhecimento de links epidemiológicos contribui para a definição de se determinada distância genética é próxima ou distante.

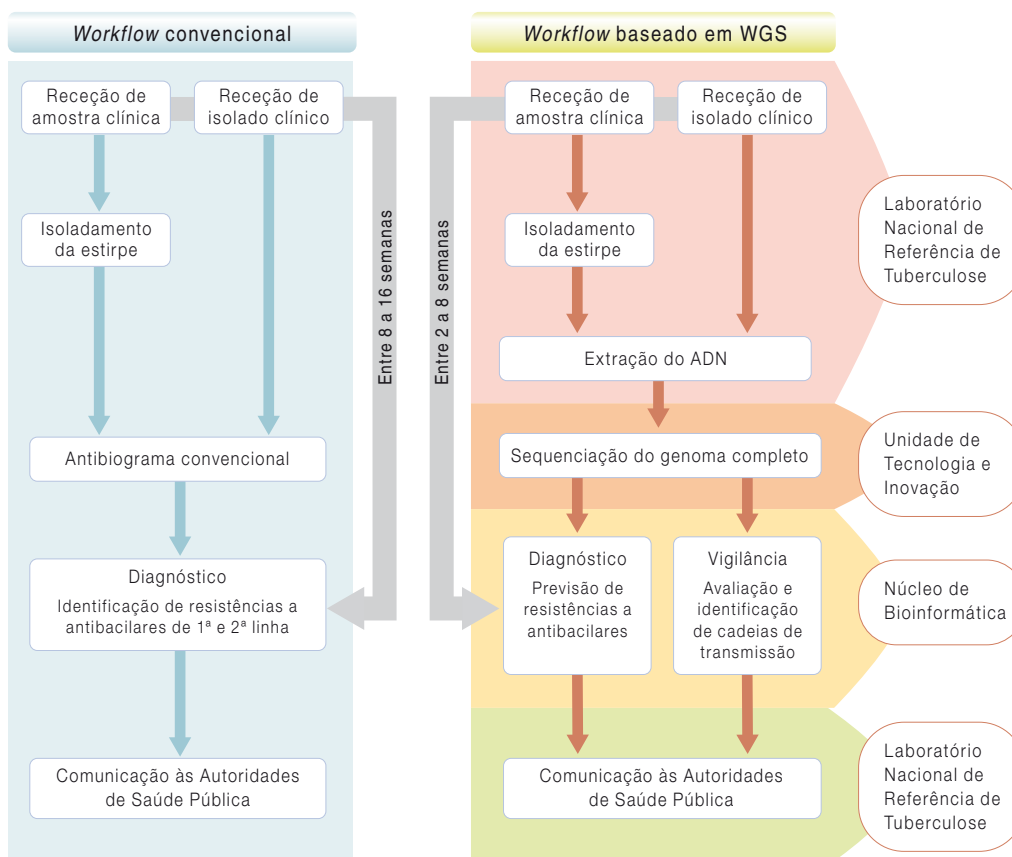
_Resultados e discussão

O presente estudo descreve a implementação de uma metodologia de vigilância laboratorial baseada em WGS, tendo em conta a exigência supranacional, a curto prazo, da substituição dos métodos tradicionais de genotipagem por MIRU-VNTR por uma abordagem assente na sequenciação do genoma completo. Para além de permitir analisar a totalidade do genoma para determinar potenciais cadeias de transmissão, esta metodologia permite, simultaneamente, a deteção dos vários marcadores genéticos de resistência (figura 1).

Para este efeito, 83 estirpes de TB-M/XDR isoladas entre 2013 e 2017, foram caracterizadas por MIRU-VNTR e por WGS em simultâneo. Este é o primeiro estudo a ser realizado em Portugal com estes objetivos específicos e envolve todas as estirpes M/XDR isoladas nos últimos 5 anos.

Todas as estirpes foram analisadas relativamente à presença/ausência de mutações associadas à resistência aos antibióticos de 1ª e 2ª linha através da utilização de plataformas gratuitas e *online* que permitem usar diretamente os dados de sequenciação de nova geração. Para a validação destes dados foi efetuado um estudo piloto (12) que definiu a estratégia adotada pelo LNR-TB e a plataforma com maior congruência (TB Profiler) com os resultados fenotípicos. Observou-se uma correlação superior a 90% entre os resultados genotípicos e os resultados obtidos com os testes de suscetibilidade convencionais. Desta forma, através da sequenciação total do

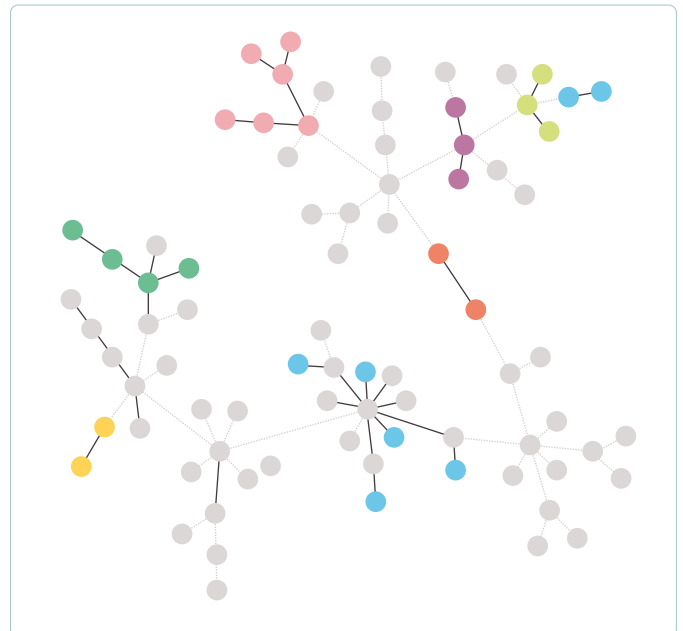
Figura 1: Fluxograma do diagnóstico laboratorial baseado em metodologias convencionais e em sequenciação do genoma completo (*whole genome sequencing - WGS*).



genoma de uma estirpe MTC é possível prever fenótipos de resistência em cerca de uma semana, acelerando o diagnóstico de um possível caso de TB-M/XDR em cerca de 10 semanas.

Neste estudo, e relativamente à definição de possíveis cadeias de transmissão verificou-se, numa primeira abordagem e tal como seria previsto, que estirpes com o mesmo perfil MIRU-VNTR revelaram maior proximidade genética, muito embora também se tenha observado a existência de ligações genéticas muito próximas entre estirpes com perfis distintos de MIRU-VNTR. Para validar a definição dos *clusters* encontrados e usando esta nova abordagem baseada em WGS, correlacionou-se os dados moleculares obtidos com a informação epidemiológica disponível acerca dos doentes. Como esperado, observou-se existir uma boa correlação entre a proximidade genética das estirpes e a força do vínculo epidemiológico dos doentes. De facto, todas as estirpes isoladas de doentes com ligações fortes (familiares, amigos e colegas de trabalho) apresentaram uma elevada proximidade genética, isto é, com um cutoff abaixo de 0,4% de diferenças alélicas entre as estirpes (figura 2). Quanto aos doentes sem ligação epidemiológica conhecida as diferenças genéticas foram superiores a o cutoff estabelecido e aos limites previamente descritos noutros estudos envolvendo fenómenos de transmissão recentes (7,8,18-20). No entanto, é importante referir que encontramos estirpes muito próximas para as quais não havia dados epidemiológicos disponíveis, levantando a hipótese de que algumas ligações entre doentes não terão sido detetadas. Esta observação ilustra a necessidade de melhorar a deteção e investigação epidemiológica precoces (por exemplo, melhorando as investigações “de campo” e fortalecendo a comunicação entre as autoridades de saúde e o LNR-TB) para aliar os benefícios de uma vigilância laboratorial focada na deteção/confirmação de relações entre doentes, mais rápida e baseada em WGS, facilitando assim o rastreio de contatos. Finalmente, considerando que esta metodologia se baseia totalmente em ferramentas bioinformáticas gratuitas e disponíveis *online*, acredita-se que a abordagem do presente estudo pode ser muito útil para todos os laboratórios com acesso a estas tecnologias, especialmente para aqueles com menos recursos.

Figura 2: ↓ Árvore filogenética simplificada de todas as estirpes analisadas, ilustrando a proximidade genética das estirpes de MTC baseada na aplicação de WGS.



Cada círculo representa um perfil genético; os círculos a cores representam grupos moleculares de estirpes com ligação epidemiológica confirmada; a cinzento – são grupos moleculares sem informação epidemiológica disponível. As estirpes com proximidade genética (i.e., abaixo do *cut-off* definido no estudo) estão ligadas com linhas contínuas.

_Conclusão

O LNR-TB do INSA está, neste momento, em condições de garantir uma vigilância laboratorial baseada em WGS que, por ser mais robusta e atempada, permite a deteção rápida de novos casos de doença, a monitorização de cadeias de transmissão existentes e a determinação célere de novas cadeias. A articulação entre as diferentes unidades do INSA (figura 1) têm garantido o sucesso da execução rápida deste *workflow* de diagnóstico, diminuindo os tempos de resposta e aumentando o poder de discriminação e confiança dos resultados obtidos. A centralização deste diagnóstico e a genotipagem molecular por WGS, associadas à melhoria da articulação com as entidades clínicas e de saúde pública, constitui a força motriz para uma vigilância mais rápida e efetiva dos casos de TB-M/XDR, favorecendo assim a previsão da resistência aos antibióticos e a deteção precoce de cadeias de transmissão.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) no âmbito do projeto Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana (UID/BIM/0009/2016) e desenvolvido no âmbito do projeto GenomaPT (POCI-01-0145-FEDER-022184), cofinanciado pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (Compete2020), Programa Operacional Regional de Lisboa (Lisboa 2020) e Programa Operacional Regional do Algarve (CRESC Algarve2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), e pela FCT.

Agradece-se à Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. 20th ed. Geneva: WHO, 2015. <http://www.who.int/iris/handle/10665/191102>.
- (2) World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: WHO, 2018. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- (3) Programa Nacional para a Tuberculose. Tuberculose em Portugal: Desafios e estratégias. 2018. Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2018. <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie-963780-pdf.aspx?v=11736b14-73e6-4b34-a8e8-d22502108547>
- (4) Programa Nacional para a Infeção VIH, Sida e Tuberculose. Programa Nacional para a Infeção VIH, SIDA e Tuberculose 2017. Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2017. <http://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie-875387-pdf.aspx?v=11736b14-73e6-4b34-a8e8-d22502108547>
- (5) Pfyffer GE, Wittwer F. Incubation time of mycobacterial cultures: how long is long enough to issue a final negative report to the clinician? *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):4188-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3502948/>
- (6) Roetzer A, Diel R, Kohl TA, et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med.* 2013;10(2):e1001387. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3570532/>
- (7) Kohl TA, Diel R, Harmsen D, et al. Whole-genome-based Mycobacterium tuberculosis surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *J Clin Microbiol.* 2014 ;52(7):2479-86. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4097744/>
- (8) Kohl TA, Harmsen D, Rothgänger J, et al. Harmonized Genome Wide Typing of Tubercle Bacilli Using a Web-Based Gene-By-Gene Nomenclature System. *EBioMedicine.* 2018;34:131-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116475/>
- (9) Bravo LT, Tuohy MJ, Ang C, et al. Pyrosequencing for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis resistance to rifampin, isoniazid, and fluoroquinolones. *J Clin Microbiol.* 2009;47(12):3985-90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786679/>
- (10) Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.* 2010;363(11):1005-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2947799/>
- (11) Satta G, Atzeni A, McHugh TD. Mycobacterium tuberculosis and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(2):69-72. Epub 2016 Sep 15. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.005>
- (12) Macedo R, Nunes A, Portugal I, et al. Dissecting whole-genome sequencing-based online tools for predicting resistance in Mycobacterium tuberculosis: can we use them for clinical decision guidance? *Tuberculosis (Edinb).* 2018;110:44-51.
- (13) Satta G, Lipman M, Smith GP, et al. Mycobacterium tuberculosis and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(6):604-609. Epub 2017 Nov 3. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.030>
- (14) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa nº 1/DT de 11/01/2007. Testes de Sensibilidade aos Antituberculosos de 2ª Linha. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-1dt-de-11012007.aspx>
- (15) Coll F, McNERNEY R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* 2015;7(1):51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446134/>
- (16) Silva M, Machado MP, Silva DN, Rossi M, Moran-Gilad J, Santos S, Ramirez M, Carriço JA. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microbial Genomics* 2018; 4(3): e000166.
- (17) Ribeiro-Gonçalves B, Francisco AP, Vaz C, et al. PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W246-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987911/>
- (18) Cabibbe AM, Walker TM, Niemann S, et al. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis. *Eur Respir J.* 2018;52(5). pii: 1801163.
- (19) Walker TM, Ip CL, Harrell RH, et al. Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):137-46. Epub 2012 Nov 15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556524/>
- (20) Cabibbe AM, Trovato A, De Filippo MR, et al. Countrywide implementation of whole genome sequencing: an opportunity to improve tuberculosis management, surveillance and contact tracing in low incidence countries. *Eur Respir J.* 2018;51(6). pii: 1800387.

Sequenciação de nova geração e efectividade da vacina antigripal: um estudo sobre o vírus da gripe A(H3), em doentes com síndrome gripal, épocas 2016/2017 e 2017/2018

New generation sequencing and effectiveness of the influenza vaccine: a study on influenza A (H3) virus in patients with influenza, 2016/2017 and 2017/2018

Pedro Pechirra¹, Vítor Borges², Paula Cristóvão¹, Inês Costa¹, Patrícia Conde¹, Ausenda Machado³, Ana Paula Rodrigues³, Verónica Gomez³, Irina Kislaya³, Joana Mendonça⁴, Baltazar Nunes³, João Paulo Gomes², Raquel Guiomar¹

pedro.pechirra@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Núcleo de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(4) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

A tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) permite uma análise genética do vírus da gripe muito mais profunda, quando comparada com a sequenciação pelo método de Sanger, pois permite a análise do genoma viral completo (e não apenas do gene da hemaglutinina). O presente estudo teve como objectivo realizar a análise filogenética e mutacional do vírus da gripe A(H3) de forma a pesquisar possíveis marcadores genéticos e padrões de recombinação que estejam relacionados com a efectividade vacinal. Foram obtidas sequências do genoma completo para 179 vírus A(H3), detectados em casos de síndrome gripal no âmbito do projecto EuroEVA/I-MOVE+ durante duas épocas de gripe: 2016/2017 e 2017/2018. Dos vírus sequenciados, 28 pertenciam a vírus de casos vacinados (15,6%). Destes, apenas 16 apresentaram mutações não encontradas em casos não vacinados, no entanto, todas elas emergiram de forma esporádica. Foi revelada a existência de recombinação genómica intrasubtípica, e identificados 4 perfis distintos de recombinação. O grupo em que todos os segmentos genómicos são semelhantes a A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 foi o que registou uma maior percentagem de falhas da vacina (20,3%).

_Abstract

Next-generation sequencing technology allow a much deeper genetic analysis of influenza virus comparing to Sanger sequencing, since allows a whole genome analysis instead of a HA-based one. The present study aimed to perform phylogenetic and mutational analysis of influenza A(H3) viruses in order to search for putative genetic markers, as well as reassortment patterns related with vaccine effectiveness. Were obtained whole genome sequences for 179 influenza A(H3) viruses, detected in ILI cases in the scope of EuroEVA/I-MOVE+ project during 2 winter seasons: 2016/2017 and 2017/2018. From sequenced viruses, 28 were from vaccinated cases (15.6%). From these, 16 presented mutations, not found in viruses from non-vaccinated cases, however, these mutations have emerged sporadically. Were identified four different patterns of intrasubtype reassortment. The group with an A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016-like profile included a higher percentage of vaccine failures (20.3%).

_Introdução

As técnicas de sequenciação de nova geração (NGS, na sigla em inglês) são usadas ainda de uma forma incipiente na vigilância epidemiológica da gripe. Quebrando barreiras de ordem técnica e económica inerentes à sequenciação pelo método de Sanger, a NGS facilita a sequenciação do genoma viral completo. Além da caracterização genética, esta abordagem permite também a detecção de eventos de recombinação genómica, de marcadores de resistência, de virulência, variantes minoritárias, variabilidade intra-hospedeiro, entre outros.

Vários fatores (relacionados, por exemplo, com o vírus influenza e/ou com o hospedeiro, ou com a toma da vacina antigripal e a sua constituição) podem contribuir para baixas/moderadas estimativas da efectividade da vacina antigripal em épocas onde o vírus A(H3) é predominante (1). No que respeita às características do vírus da gripe, uma das questões que normalmente se coloca é se existe(m) e qual(quais) a(s) causa(s) genética(s) e/ou antigénica(s) que justifique(m) a falha da vacina antigripal.

_Objetivo

Este estudo tem como objetivo a análise do genoma completo do vírus da gripe de forma a pesquisar a associação entre características genéticas do vírus (mutações pontuais, padrões de recombinação) e as falhas da vacina antigripal, ou seja, indivíduos vacinados e que foram infetados pelo vírus da gripe A(H3).

Material e métodos

Exsudados da nasofaringe foram colhidos em casos de síndrome gripal aquando de consulta em cuidados de saúde primários no âmbito do projecto EuroEVA/I-MOVE+, durante duas épocas de gripe: 2016/2017 e 2017/2018. Além dos dados clínicos e epidemiológicos, foi recolhida a informação sobre a toma da vacina. Após extracção de RNA e amplificação do genoma viral por PCR (2), foi sequenciado por NGS o genoma completo de 179 vírus da gripe do subtipo A(H3): 163 da época 2016/2017 e 16 de 2017/2018. A sequenciação por NGS foi realizada na plataforma MiSeq (Illumina) e a análise bioinformática das leituras obtidas na plataforma online INSA-FLU (3) (<https://insaflu.insa.pt/>) com uma cobertura média de 1075x. As sequências *consensus* foram adicionalmente analisadas com o programa MEGA 7 (4). Para testar a associação entre os perfis de recombinação e a falha vacinal foi usado o teste exato de Fisher (o nível de significância foi estabelecido em 5%).

Resultados

Caracterização genética do vírus da gripe pré-NGS

Antes de o Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge ter implementado a NGS na vigilância laboratorial da gripe, a caracterização dos vírus da gripe era realizada essencialmente através da sequenciação da subunidade HA1 do

gene da hemaglutinina (este procedimento ainda hoje é utilizado quando é necessária uma caracterização genética urgente de poucas amostras virais).

Os vírus da gripe A(H3) estudados agruparam-se em 5 diferentes subgrupos genéticos, segundo classificação baseada no gene da hemaglutinina (5) (tabela 1 e figura 1).

A maioria (44,1%) pertenceu ao subgrupo genético 3C.2a1, que circulou em 2016/2017 e que é representado pela estirpe vacinal 2018/2019 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (6), e apresentou as substituições N171K, situada em local antígeno (Ia), I406V e G484E. A maior parte dos vírus 3C.2a1 apresentou também a substituição R142G (Ia). No subgrupo 3C.2a1 registaram-se 15,2% de casos de falha da vacina antigripal.

Dentro do subgrupo 3C.2a1 insere-se o subgrupo 3C.2a1b (representado por A/England/74560298/2017) que inclui 23,5% (42/179) dos vírus A(H3) analisados. Além das substituições atrás mencionadas para os vírus 3C.2a1, estes vírus incorporaram as substituições K92R, N121K e H311Q (todas em locais antigénicos). As falhas da vacina constituíram 19% (8/42) dos vírus neste subgrupo (tabela 1).

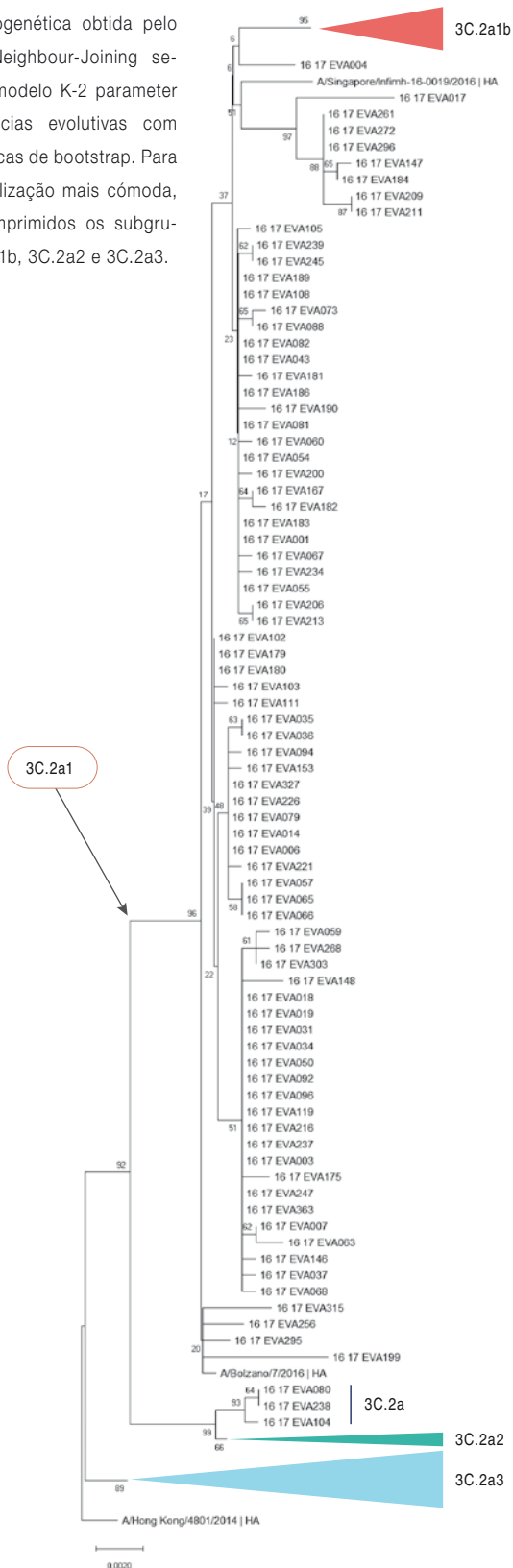
Um subgrupo que também atingiu uma grande expressão foi o 3C.2a3, ao qual pertenciam 25,7% (46/179) dos vírus A(H3). Os vírus deste subgrupo detetado em 2016/2017 e representado pela estirpe A/Norway/4849/2016, apresentaram as substituições N121K (Ia) e S144K (Ia). Neste subgrupo os

Tabela 1: Subgrupos genéticos do vírus A(H3) em 179 doentes com síndrome gripal, 2016/2017 e 2017/2018.

Subgrupos genéticos	2016/2017	2017/2018	Total 2 épocas	%	Vacinados	%
3C.2a	3	–	3	1,7	1	33,3
3C.2a1	79	–	79	44,1	12	15,2
3C.2a1b	34	8	42	23,5	8	19,0
3C.2a2	1	8	9	5,0	0	0,0
3C.2a3	46	–	46	25,7	7	15,2
Total A(H3)	163	16	179	100,0	28	15,6

Figura 1: Filogenia dos vírus da gripe A(H3) em estudo (n=179), baseada no gene da hemaglutina.

Árvore filogenética obtida pelo método Neighbour-Joining segundo o modelo K-2 parameter de distâncias evolutivas com 1000 réplicas de bootstrap. Para uma visualização mais cómoda, foram comprimidos os subgrupos 3C.2a1b, 3C.2a2 e 3C.2a3.



casos vacinados totalizaram 15,2% (12/79). Foram ainda caracterizados 3 vírus (1,7%; 3/179) como pertencentes ao subgrupo 3C.2a, representado pela estirpe vacinal 2017/2018 A/Hong Kong/4801/2014 (7). Estes vírus apresentavam as substituições T131K (1a) e R142K (1a). Uma vez que um dos vírus era proveniente de um caso vacinado, a proporção de falhas da vacina neste subgrupo foi de 33,3% (1/3).

Além das 2 substituições anteriores, os vírus do subgrupo 3C.2a2 apresentaram adicionalmente a substituição R261Q (1a). No conjunto das 2 épocas, os vírus 3C.2a2 constituíram apenas 5% (9/179) dos vírus analisados, no entanto, estes foram os predominantes em circulação na época 2017/2018. Não foram registadas falhas da vacina no grupo dos vírus 3C.2a2 sequenciados.

Na totalidade dos vírus A(H3) sequenciados, 15,6% (28/179) correspondiam a casos vacinados. Ao analisar a hemaglutina destes vírus verificámos a existência de 8 substituições em 7 vírus que não foram encontradas em vírus dos casos não vacinados: G5R, S46F, S124I, N126D, F193S, I230L, D408N e L531S. No entanto qualquer uma destas substituições foi esporádica, ou seja, foram observadas apenas num vírus.

Caracterização genética do vírus da gripe pós-NGS

A implementação da NGS na vigilância da gripe veio alargar e aprofundar a caracterização genética do vírus da gripe pois permite a sequenciação do genoma viral completo, para um maior número de vírus e de uma forma mais rápida e económica.

Os genomas completos dos 179 vírus A(H3) em análise foram monitorizados quanto à existência de possíveis marcadores moleculares associados aos casos de falha vacinal. A tabela 2 mostra-nos as substituições encontradas em todos os segmentos genómicos de vírus detetados em casos vacinados. Podemos verificar que as substituições não são comuns aos vírus estudados. Além disso, no nosso estudo, 12 dos vírus detetados em casos vacinados foram geneticamente idênticos, à escala do genoma, a outros vírus detetados em casos não vacinados.

Tabela 2: ▾ Substituições de aminoácidos em relação à estirpe vacinal 2017/2018 (A/Hong Kong/4801/2014), presentes em vírus detetados nos 28 casos vacinados.

Casos vacinados	Época de gripe	PB2	PB1	PB1-F2	N40	PA	PA-X	HA	NP	NA	M1	M2	NS1	NS2	Total substituições / vírus
EVA079	2016/2017	R251G								V116A					2
EVA080								G5R		V240I					2
EVA088															0
EVA089								L531S							1
EVA091													P212H	L55I	2
EVA094						L469M		S124I					T49A		3
EVA102															0
EVA107								I230L		I307L					2
EVA119													Q63K		1
EVA124															0
EVA126															0
EVA133															0
EVA157															0
EVA162								F193S	M163L						2
EVA163															0
EVA164										V165I					1
EVA169						N350K		S46F, N126D		E344K	V15I				5
EVA182						N359T			K452R						2
EVA186											N236K				1
EVA200															0
EVA209															0
EVA221						I407M				S332P					2
EVA239		V731M													1
EVA250															0
EVA263															0
EVA268							V192G			I20T					2
EVA311								D408N			V138I				2
EVA089	2017/2018														0
Total substituições / segmento		2	0	0	0	4	1	8	2	7	3	0	3	1	31

A plataforma INSaFLU permite aferir da maior semelhança genética entre segmentos genómicos dos vírus analisados e de estirpes de referência de diferentes subgrupos disponíveis. Comparando cada segmento viral com o genoma de estirpes representativas de dois grandes subgrupos genéticos (o subgrupo 3C.2a, representado pela estirpe vacinal 2017/2018

A/Hong Kong/4801/2014, e o subgrupo 3C.2a1, representado pela estirpe vacinal 2018/2019 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016), foi possível revelar quatro diferentes perfis de recombinação intrasubtípica existente nos vírus A(H3) em estudo (tabela 3).

Tabela 3: ▾ Perfis de recombinação intrasubtípica encontrados nos vírus A(H3) em 2016/2017 e 2017/2018.

Perfis de recombinação									n	%	Vacinados	%
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	69	38,5	14	20,3
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	8	4,5	0	0,0
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	52	29,1	6	11,5
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	50	27,9	8	16,0
Total									179	100,0	28	15,6

3C.2a (A/Hong Kong/4801/2014)

3C.2a1 (A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016)

O perfil de recombinação mais frequente (69/179; 38,5%) foi aquele em que todos os segmentos genómicos mostraram ser mais próximos geneticamente do subgrupo 3C.2a1. Este foi também o perfil que incluiu mais casos de falhas da vacina (14/69; 20,3%).

O segundo perfil, onde a proteína da matriz é “3C.2a-like” e os restantes genes são “3C.2a1-like” atinge a representatividade de 29,1% (52/179). Neste grupo, 11,5% (6/52) dos vírus foi detetado em casos vacinados.

Um terceiro perfil constituiu 27,9% (50/179) dos vírus A(H3) analisados. Os vírus deste grupo contêm uma hemaglutinina e uma proteína da matriz 3C.2a-like com os restantes genes revelando ser “3C.2a1-like”. Os vírus provenientes de casos vacinados constituíram 16% (8/50) dos vírus com este perfil de recombinação.

Um quarto perfil, com uma hemaglutinina “3C.2a-like” e restantes genes “3C.2a1-like”, representou apenas 4,5% (8/179) dos vírus analisados. Nenhum dos vírus com este perfil foi detetado em casos vacinados.

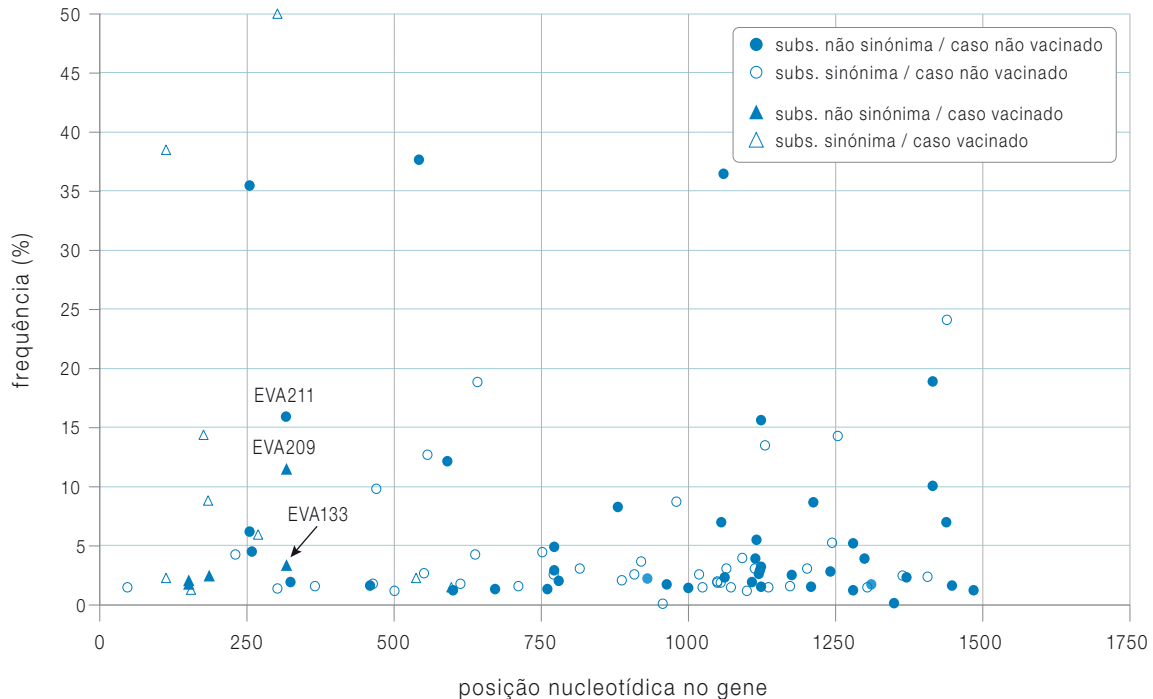
Apesar das diferenças observadas quanto à proporção de casos de falha da vacina, não se verificou associação estatisticamente significativa entre as falhas da vacina e determinado perfil de recombinação ($p=0,424$).

A análise de variantes minoritárias intra-hospedeiro (iSNVs - *intra-host single nucleotide variants*) é outra mais-valia para a vigilância laboratorial da gripe, possibilitada pela NGS.

Nos vírus A(H3) detetados nos 28 casos vacinados, das iSNVs identificadas, apenas uma era redundante: a variante G315T (M105I) do gene da nucleoproteína nos casos EVA133 (2016/17) e EVA209 (2016/17), com frequências de 3,21% e 11,33%, respectivamente. No entanto, esta mesma iSNV foi encontrada num caso não vacinado: EVA211 (2016/17) com uma frequência de 15,74% (figura 2). De referir que estes 3 casos, apesar de a data de início da doença se ter registado num intervalo de 2 semanas, não tinham proximidade geográfica, e também pertenciam a diferentes subgrupos genéticos.

Todas as outras iSNVs identificadas em casos vacinados surgiram apenas isoladamente num único vírus.

Figura 2: ↓ Frequência e distribuição das variantes minoritárias intra-hospedeiro ($\leq 50\%$) ao longo do gene da nucleoproteína para todos os vírus da gripe A(H3) em estudo (n=179).



Discussão e conclusões

Os 179 vírus A(H3) analisados neste estudo agruparam-se em 5 subgrupos genéticos: 3C.2a, 3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2 e 3C.2a3, sendo o subgrupo 3C.2a1 o mais representado durante as 2 épocas de gripe. Os vírus detectados em falhas da vacina constituíram 15,6% dos casos.

O conhecimento do genoma viral completo permite também analisar uma importante característica dos vírus da gripe – a recombinação entre segmentos genómicos que pode ocorrer quando uma célula é infectada por dois ou mais vírus da gripe. Foram identificados 4 perfis de recombinação intra-subtípica, cada um deles com uma proporção diversa de casos vacinados. No entanto, as diferenças encontradas entre os diferentes perfis não têm significância estatística.

Habitualmente, a população viral inerente a uma infecção pelo vírus da gripe é representada por uma sequência *consensus* que representa o nucleótido mais frequente para cada posição do genoma. Mas o que ocorre na realidade é que cada infe-

ção gera uma população geneticamente diversa de variantes virais, quer através de novas mutações pontuais, quer através da transmissão destas variantes minoritárias de hospedeiro para hospedeiro (8). A análise das iSNVs pode contribuir para a nossa compreensão da evolução e epidemiologia do vírus da gripe, como a transmissão entre hospedeiros, a selecção antigénica ou a terapêutica antiviral. Nos casos de falha da vacina apenas foi encontrada uma iSNV redundante no segmento que codifica a nucleoproteína, a mutação pontual G315T que implica a substituição de aminoácido M105I. Esta substituição ocorrida na nucleoproteína dos vírus A(H3) não foi anteriormente descrita por outros autores ou previamente associada a características virais.

É possível que a baixa efetividade da vacina (EV=18,9%) (9) registada em 2016/2017, onde os vírus A(H3) constituíram a maioria dos vírus detetados, esteja de alguma forma relacionada com a grande diversificação genética destes vírus registada ao nível filogenético e da recombinação genómica. A efetividade da vacina registada em 2017/2018 foi mais

elevada (EV=63,7%) (10), mas nesta última época o vírus predominante em circulação pertencia ao tipo B (linhagem Yamagata), sendo que a efectividade vacinal específica do subtipo A(H3) não foi possível estimar devido ao reduzido número de vírus deste subtipo detetados.

Em conclusão, neste estudo, não foi encontrada uma associação entre um grupo genético, sequência nucleotídica específica, variante minoritária ou perfil de recombinação e os casos de falhas vacinais. Para além do estudo de fatores (genéticos ou imunológicos) relacionados com o hospedeiro, será ainda essencial enriquecer o conhecimento atual sobre o impacto da imunidade induzida pela vacina na diversidade da população viral intra- e inter-hospedeiro, nomeadamente através de estudos específicos sobre dinâmica populacional do vírus da gripe durante o processo infeccioso.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito I-MOVE/I-MOVE+ financiado pelo programa Horizonte 2020 e pelo *European Centre for Disease Prevention and Control*. Agradece-se a todos os médicos participantes no projeto EuroEVA/I-MOVE durante as épocas 2016/2017 e 2017/2018; e à Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Belongia EA, Simpson MD, King JP, et al. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(8):942-51.
- (2) Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, et al. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. *J Virol*. 2009;83(19):10309-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748056/>
- (3) Borges V, Pinheiro M, Pechirra P, et al. INSAFLU: an automated open web-based bioinformatics suite "from-reads" for influenza whole-genome-sequencing-based surveillance. *Genome Med*. 2018;10(1):46. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0555-0>
- (4) Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.
- (5) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterisation, summary Europe, May 2018. Stockholm: ECDC, 2018. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/ECDC-Flu-Characterisation-Report-May-2018.pdf>
- (6) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018-2019 northern hemisphere influenza season, February 2018. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201802_recommendation.pdf?ua=1
- (7) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017-2018 northern hemisphere influenza season, March 2017. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201703_recommendation.pdf?ua=1
- (8) Xue KS, Moncla LH, Bedford T, et al. Within-Host Evolution of Human Influenza Virus. *Trends Microbiol*. 2018;26(9):781-93.
- (9) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Influenza Vaccine Effectiveness in Portugal. Season 2016/17 Report. Lisboa, 2017.
- (10) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Influenza Vaccine Effectiveness in Portugal. Season 2017/18 Report. Lisboa, 2018.

Sequenciação do genoma completo como ferramenta da epidemiologia molecular: caracterização de estirpes de *Neisseria meningitidis* do serogrupo W isoladas em Portugal

Whole genome sequencing as a tool for molecular epidemiology: characterization of Neisseria meningitidis serogroup W strains isolated in Portugal

Célia Bettencourt, Alexandra Nunes, Maria João Simões

M.Joao.Simoes@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de *Neisseria meningitidis*. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

Neisseria meningitidis é um comensal da nasofaringe que ocasionalmente causa doença invasiva. Os serogrupos são definidos com base nos antígenos capsulares e a similaridade genética, avaliada por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), permite agrupar as estirpes em complexos clonais (cc). Na Europa, os serogrupos B e C têm sido os mais prevalentes. Desde a epidemia com origem no Hajj em 2000, observa-se uma incidência crescente de doença invasiva meningocócica (DIM) por estirpes W (MenW), maioritariamente as designadas como a linhagem Hajj. Pertencendo ao cc11, estas estirpes dispersaram-se e evoluíram para várias sublinhagens, nomeadamente a sul-americana, à qual está associada DIM com apresentação clínica atípica e letalidade elevada. É objetivo deste estudo conhecer as características genómicas das estirpes MenW isoladas em Portugal e compreender a sua relação evolutiva entre estirpes cc11 do mesmo serogrupo, com uma distribuição geográfica e temporal diversa. Caracterizaram-se as estirpes invasivas MenW isoladas em Portugal entre 2012 e 2018, por MLST e por sequenciação do genoma completo (WGS). Para comparação genómica selecionaram-se os genomas MenWcc11 disponíveis na base de dados *Neisseria* PubMLST. A análise bioinformática foi realizada com o software chewBBACA e a possível relação evolutiva foi analisada aplicando o algoritmo GoeBURST na plataforma PHYLOViZ Online. No período em análise registaram-se 9 casos de DIM por MenW em Portugal, agrupadas apenas em dois genótipos cc22 e cc11. As estirpes MenW cc11 incluídas no estudo (4 invasivas e 2 de portadores) distribuíram-se nas sublinhagens *Original UK* e *Novel UK*, emergidas sequencialmente a partir das estirpes sul-americanas, e numa linhagem da região distal. Tal poder de diferenciação nunca teria sido possível utilizando a metodologia tradicional de caracterização do genótipo (sequenciação de Sanger). O cenário em Portugal é semelhante ao observado noutros países europeus, o que reforça a importância da vigilância da DIM, potencialmente com um quadro clínico atípico e letalidade elevada. A metodologia de WGS é uma ferramenta fundamental nesta vigilância e no estudo de surtos pelo seu poder de diferenciação.

_Abstract

Neisseria meningitidis is a commensal that colonises the nasopharynx and occasionally causes invasive disease. Capsular polysaccharides define the meningococci serogroups and *Multilocus Sequence Typing* (MLST) identifies genetic similarities gathering strains into clonal com-

plexes (cc). Serogroups B and C have been the most prevalent in Europe however, since the Hajj epidemics, in 2000, invasive meningococcal disease (IMD) due to W strains (MenW), mostly the referred as the Hajj lineage, are been increasing. Belonging to cc11, these strains spread and evolved into different sublineage, namely the South American that is associated to an atypical clinical presentation and high fatality rate. This study aims to characterize genetically Portuguese MenW strains and understand the evolutionary relationship with MenWcc11 with diverse geographic and temporal distribution. Invasive MenW strains isolated in Portugal from 2012 to 2018 were characterized by MLST and whole genome sequencing (WGS). For genomic comparison, MenWcc11 available genomes were selected from *Neisseria* PubMLST database. The software chewBBACA was used for bioinformatics analysis and the algorithm GoeBURST from the PHYLOViZ Online platform was used for analysis of evolutionary relationship between strains. Nine cases of IMD due to MenW were observed in Portugal in this 7 years study. Just two genotypes were identified belonging to cc22 and cc11. The MenWcc11 isolates included in this study (4 invasive and 2 from carriers) were clustered into the sublineages *Original UK* and *Novel UK*, that successively emerged from South American strains, and into a distal region lineage. Such differentiation power would never been possible using the traditional genotype characterization methodology (Sanger sequencing). The scenario in Portugal is quite similar to other European countries, which reinforces the importance of surveillance of IMD, potentially with an atypical clinical presentation and high fatality rate. WGS is an important tool in this surveillance and for outbreaks study due to its power to differentiate strains.

_Introdução

Neisseria meningitidis é uma bactéria estritamente humana, um comensal do trato respiratório superior, mas que é ainda uma importante causa de infeção invasiva no mundo inteiro, apesar dos enormes progressos alcançados com a utilização de vacinas na redução da morbilidade e mortalidade devidas a esta infeção (1). Dos 12 serogrupos conhecidos, definidos

com base nas características antigénicas dos polissacáridos capsulares, apenas seis (A, B, C, W, X e Y) são responsáveis pela quase totalidade dos casos de doença invasiva meningocócica (DIM) (1). Com base na similaridade genética avaliada por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), as estirpes de meningococos são agrupadas em complexos clonais, alguns dos quais contendo estirpes reconhecidamente mais invasivas e híper virulentas (2).

Na Europa, estirpes dos serogrupos B e C têm sido as mais prevalentes, contudo, tem-se vindo a observar uma incidência crescente de DIM por estirpes do serogrupo W (MenW) (3). No Reino Unido, no ano epidemiológico 2008-2009, os casos de DIM por MenW corresponderam a 1,8% do total de casos confirmados, enquanto que em 2013-2014 os casos por MenW aumentaram em todos os grupos etários, correspondendo a 15% do total de casos confirmados (4).

A primeira epidemia global, documentada, causada por *Neisseria meningitidis* do serogrupo W teve origem no Hajj (peregrinação anual a Meca), em 2000, e foi causada por uma estirpe híper virulenta do complexo clonal ST11 (cc11), do subtipo P1.5.2, designada a partir de então como a linhagem Hajj (5). Devido à dispersão geográfica desta estirpe surgiram surtos em vários países africanos e sul-americanos.

O estudo do genoma completo das estirpes cc11 (todos os serogrupos) por sequenciação de nova geração (NGS) permitiu identificar duas linhagens diferentes: a linhagem 11.1, na qual estão incluídas todas as estirpes MenW cc11, e a linhagem 11.2, onde se incluem estirpes dos serogrupos B e C do cc11. A linhagem 11.1 evoluiu para várias sublinhagens, nomeadamente a sul-africana e a sul-americana, supostamente devido a diversificação genómica e expansão clonal (6). Da sublinhagem sul-americana, emergida na primeira década de 2000, emergiram, em 2009, a sublinhagem *original UK* e, em 2013, a sublinhagem *novel UK* (7).

O alerta para a apresentação clínica atípica e as altas taxas de letalidade associadas à DIM por estirpes MenW da sublinhagem sul-americana foi dado em 2013, pela análise de casos de DIM por MenW:cc11 registados no Chile em 2012 (8). Numa primeira avaliação, os principais sinais e sintomas nestes doentes foram a febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (60,3% dos doentes), síndrome

gripal (52,5% dos doentes), náuseas e vômitos (46,7%) e diarreia (35,6%). Apenas 8,7% dos doentes apresentavam sinais meníngeos. A taxa de letalidade foi de 31,7% (8). Não é claro se a letalidade tão elevada se ficou a dever a fatores de virulência bacterianos ou se ao atraso no diagnóstico, consequência de um quadro clínico atípico.

_Objetivo

Embora as estirpes invasivas MenW não sejam muito frequentes em Portugal, é importante conhecer a sua evolução genética, dado o histórico da doença nos seus aspetos clínicos e epidemiológicos. É objetivo deste estudo conhecer as características genómicas das estirpes MenW isoladas em Portugal e compreender a sua relação evolutiva entre estirpes do mesmo serogrupo e complexo clonal, o cc11, com uma distribuição geográfica e temporal diversa.

_Material e métodos

Seleção da amostra

As estirpes de *Neisseria meningitidis* dos casos reportados de DIM, isoladas nos laboratórios hospitalares, são enviadas ao Laboratório Nacional de Referência de *Neisseria meningitidis* no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

A identificação dos serogrupos foi realizada através da técnica de PCR em tempo real. Os restantes marcadores definidores do genótipo (subtipo, FetA e tipo de sequência e complexo clonal identificados por MLST), foram identificados por sequenciação completa do genoma (WGS, na sigla em inglês). A metodologia de WGS foi realizada como descrito num estudo nosso recentemente publicado (9).

Neste estudo foram analisados os genótipos das estirpes invasivas do serogrupo W isoladas em Portugal no período de 2012 a 2018. Para comparação genómica foram selecionados os genomas das estirpes portuguesas MenW cc11, bem como todos os genomas das estirpes MenW cc11 disponíveis na base de dados *Neisseria* PubMLST (<http://PubMLST.org/neisseria>) (até 15 de novembro de 2018). Estes genomas foram categorizados de acordo com a literatura como Anglo-French_Hajj_strain, Burkina_Faso-North_African, Endemic South African strain

Lineage_11.1_distal_region, South_American-UK , Original UK e Novel UK (6,10).

A análise bioinformática foi realizada com o software de utilização livre chewBBACA (11) e assentou numa abordagem comparativa “gene-a-gene” de um conjunto de 1605 genes de *N. meningitidis*, que constituem o esquema de core-genoma MLST (cgMLST) v1.0 disponível na base de dados *Neisseria* PubMLST (12). Para analisar a possível relação evolutiva entre os isolados W cc11 aplicamos o algoritmo GoeBURST implementado na plataforma PHYLOVIZ Online (13).

Resultados

Desde 2009, ano a partir do qual todas as estirpes invasivas foram caracterizadas pela técnica de MLST no laboratório nacional de referência de *Neisseria meningitidis*, e outubro de 2018 registaram-se 9 casos de DIM por serogrupo W em Portugal. A média de idade dos doentes foi de 56 anos, (6 a 88 anos). A caracterização de 8 destas estirpes invasivas (uma estirpe isolada em 2018 ainda em estudo) permite agrupá-las em apenas dois genótipos: W:P1.5,2:F1-1:cc11 (5 estirpes) e W:P1.18-1,3:F4-1:cc22 (3 estirpes), (tabela 1). Quatro estirpes do cc11 isoladas em 2017 e 2018 foram estudadas por WGS e incluídas neste estudo.

Para a análise filogenética selecionaram-se 1560 genomas das estirpes MenW cc11 disponíveis na base de dados *Neisseria* PubMLST, nas quais se incluem três genomas de estirpes isoladas de portadores em Portugal.

Utilizando a metodologia tradicional de caracterização do genótipo (sequenciação de Sanger), não é possível conhecer a diversidade genética das estirpes selecionadas, dado o seu caráter clonal e a fraca sensibilidade da metodologia para detetar evolução genética a partir de um ancestral comum (figura 1).

A utilização da metodologia de sequenciação de nova geração, com a sequenciação completa do genoma, permitiu distinguir duas sublinhagens, a *Original UK* e a *Novel UK*, emergidas sequencialmente a partir das estirpes sul-americanas, um ramo mais primitivo, próximo da linhagem Hajj, e um ramo na região designada como distal (figura 2).

As estirpes isoladas em Portugal foram incluídas na sublinhagem *Original UK* (uma estirpe de portador e as duas estirpes invasivas isoladas em 2017), na sublinhagem *Novel UK* (as duas estirpes invasivas isoladas em 2018) e duas das estirpes MenW isoladas de portadores (data de isolamento desconhecida) posicionaram-se na região distal (figura 2).

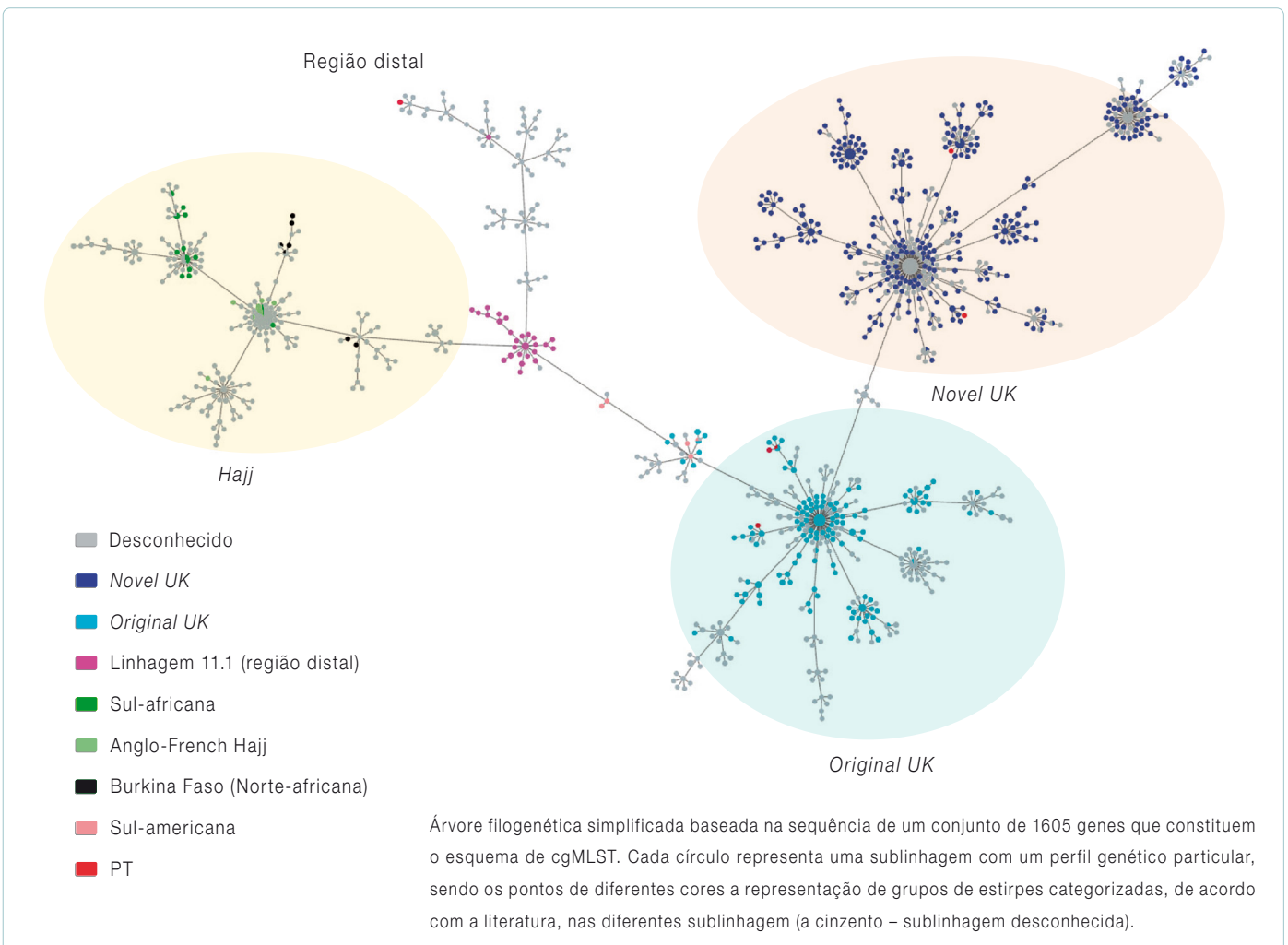
Tabela 1: Caracterização dos casos de DIM por serogrupo W registados em Portugal entre 2009 e 2018 e genótipo das respetivas estirpes invasivas.

Ano de isolamento	Nº casos W	Idade (anos)	Local de isolamento	Genótipo da estirpe MenW
2009	0	–	–	–
2010	0	–	–	–
2011	0	–	–	–
2012	1	88	Hemocultura	W:P1.18-1,3:F4-1:St184 cc22
2013	1	50	LCR	W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11
2014	0	–	–	–
2015	0	–	–	–
2016	1	6	Hemocultura	W:P1.18-1,3:F4-1:St184 cc22
2017	2	88	Hemocultura	W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11
		62	Hemocultura	W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11
2018	4	47	Hemocultura	W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11
		70	Hemocultura	W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11
		97	Hemocultura	W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11
		52	Hemocultura	(Em estudo)

Figura 1: Proximidade genética de todas as 1564 estirpes MenW cc11 analisadas.



Figura 2: Proximidade genética de todas as 1564 estirpes MenW cc11 analisadas.



Conclusões

Embora o número de estirpes invasivas MenW isoladas em Portugal e incluídas neste estudo seja baixo, o que prejudica o valor da análise, os dados indicam que o cenário em Portugal é semelhante ao que é observado noutros países europeus, nomeadamente no Reino Unido, país onde se tem observado o aumento do número de casos de DIM por MenW cc11 das linhagens emergentes da sul-americana, particularmente em adultos (14). Dadas as semelhanças, é importante ter em consideração o quadro clínico atípico e a taxa de letalidade particularmente elevada associados a estas estirpes.

Este estudo demonstra a importância da metodologia de WGS na compreensão da diversidade e evolução genéticas, e dispersão global de estirpes MenW, anteriormente todas caracterizadas num único tipo de sequência e complexo clonal, o ST11 do cc11. Esta é uma ferramenta fundamental no estudo de surtos e na monitorização das estirpes circulantes.

Agradecimentos

Aos colegas da Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA pela sua contribuição na sequenciação dos genomas e aos patologistas clínicos que colaboram na vigilância de base laboratorial da DIM.

À Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 2:B26-36. 12.032. Epub 2011 Dec 15. Review.
- (2) Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, et al. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5146-53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525265/>
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive meningococcal disease - Annual Epidemiological Report for 2016. Stockholm: ECDC, 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/invasive-meningococcal-disease-annual-epidemiological-report-2016>
- (4) Ladhani SN, Beebejaun K, Lucidarme J, et al. Increase in endemic *Neisseria meningitidis* capsular group W sequence type 11 complex associated with severe invasive disease in England and Wales. *Clin Infect Dis*. 2015;60(4):578-85. Epub 2014 Nov 10.
- (5) Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis*. 2002;185(11):1596-605.
- (6) Lucidarme J, Hill DM, Bratcher HB, et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. *J Infect*. 2015;71(5):544-52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635312/>
- (7) Eriksson L, Hedberg ST, Jacobsson S, et al. Whole-Genome Sequencing of Emerging Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup W in Sweden. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4). pii: e01409-17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869829/>
- (8) Moreno G, López D, Vergara N, et al. [Clinical characterization of cases with meningococcal disease by W135 group in Chile, 2012]. *Rev Chilena Infectol*. 2013;30(4):350-60. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000400002>
- (9) Macedo R, Nunes A, Portugal I, et al. Dissecting whole-genome sequencing-based online tools for predicting resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: can we use them for clinical decision guidance? *Tuberculosis (Edinb)*. 2018;110:44-51.
- (10) Lucidarme J, Scott KJ, Ure R, et al. An international invasive meningococcal disease outbreak due to a novel and rapidly expanding serogroup W strain, Scotland and Sweden, July to August 2015. *Euro Surveill*. 2016;21(45). pii: 30395. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5144941/>
- (11) Silva M, Machado MP, Silva DN, et al. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microb Genom*. 2018; 4(3): e000166. [Epub ahead of print]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5885018/>
- (12) Bratcher HB, Corton C, Jolley KA, et al. A gene-by-gene population genomics platform: de novo assembly, annotation and genealogical analysis of 108 representative *Neisseria meningitidis* genomes. *BMC Genomics*. 2014;15:1138. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377854/>
- (13) Ribeiro-Gonçalves B, Francisco AP, Vaz C, et al. PHYLOVIZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. *Nucleic Acids Res*. 2016 ;44(W1):W246-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987911/>
- (13) Bethea J, Makki S, Gray S, et al. Clinical characteristics and public health management of invasive meningococcal group W disease in the East Midlands region of England, United Kingdom, 2011 to 2013. *Euro Surveill*. 2016 Jun 16;21(24). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.24.30259>

Sequenciação de nova geração: o paradigma dos parasitas

New generation sequencing: the parasite paradigm

Anabela Vilares¹, Vítor Borges², Daniel Sampaio³, Luís Vieira³, Idalina Ferreira¹, Susana Martins¹, Tânia Reis¹, João Paulo Gomes², Maria João Gargaté¹

m.joao.gargate@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Unidade de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório responsável pela Toxoplasmose, infetando diferentes espécies incluindo o Homem. Na Europa e no Norte da América, *T. gondii* tem uma população clonal constituída por tipo I, II, III. No entanto, estudos recentes têm descrito uma maior diversidade genética, com a identificação de estirpes recombinantes e atípicas mais virulentas. Em Portugal, o conhecimento dos genótipos circulantes de *T. gondii* é limitado. Neste sentido, estudou-se a diversidade genética de 68 estirpes, incluindo 51 estirpes de *T. gondii* isoladas em Portugal, a estirpe de referência RH e 16 outras estirpes de referência. Neste estudo realizou-se a genotipagem clássica (Sag2), PCR multiplex de 5 microssatélites e uma combinação de sequenciações por Sanger e NGS de oito loci responsáveis pela virulência. A genotipagem clássica (tipo I, II, III) foi obtida em 100% das estirpes e mostrou que a maioria das estirpes isoladas em Portugal eram do tipo II (70,6%; 36/51) e as restantes 15 do tipo I. A análise de microssatélites por PCR multiplex aumentou o poder discriminatório em apenas mais um tipo identificado. Contudo, quando se adicionaram as metodologias de sequenciação por Sanger e NGS o poder discriminatório aumentou para 36 tipos diferentes. A combinação destas metodologias (Sanger/NGS) permitiram a identificação de uma estrutura mosaico nos isolados de *T. gondii* em Portugal, não conseguida anteriormente por qualquer uma das outras tecnologias utilizadas.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite, which is responsible for toxoplasmosis in different species, including humans. *T. gondii* have a distinct clonal population structure composed of type I, II and III lineages in North America and Europe. However, recent studies demonstrated a higher diversity given by recombinant and atypic strains, which are believed to be more virulent. The scenario of the distribution of *T. gondii* genotypes is lacking in Portugal. In order to achieve this knowledge we studied the genetic diversity of 68 *T. gondii* strains, included 51 isolated in Portugal, a reference strain RH and 16 others reference strains). We performed classical genotyping (Sag2), 5 microsatellites multiplex PCR and a combination of Sanger sequencing and Next Generation Sequencing (NGS) of eight loci likely responsible for virulence. The classical genotyping was achieved in 100% of strains. The majority of strains (70.6%; 36/51) isolated in Portugal were type II whereas the others 15 were type I. However, when Sanger and NGS sequencing methodologies were added, discriminatory power increased to 36 different

types. The combination of these methodologies (Sanger/NGS) allowed the identification of a mosaicism in the isolates of *T. gondii* in Portugal, previously not achieved by any of the other technologies used.

Introdução

Toxoplasma gondii é o parasita responsável pela Toxoplasmose infetando diferentes hospedeiros incluindo os humanos (1,2). A infeção por *T. gondii* é na sua maioria assintomática no indivíduo imunocompetente, sendo extremamente agressiva no recém-nascido, causando cegueira e/ou doença com sequelas do sistema nervoso central. Nos indivíduos imunodeprimidos a doença pode levar à morte (3).

Nos últimos anos diferentes investigadores têm adotado *Next Generation Sequencing* (NGS) em detrimento da sequenciação clássica (Sanger sequencing) (4,5). Apesar da sequenciação por Sanger permitir a identificação de alelos com uma frequência superior a 50%, quando existe mistura de genótipos, recombinação ou espécies com alelos de frequência inferior, estes são "mascarados", perdendo-se assim a sua identificação (6,7).

Existem três tipos de NGS para sequenciação de DNA: 1) a sequenciação do genoma completo (WGS, na sigla em inglês), 2) a sequenciação de todos os exões (WES) e 3) a sequenciação de zonas alvo do genoma. WGS avalia todo o conteúdo do genoma de um indivíduo em estudo, enquanto que WES sequencia apenas zonas do genoma codificantes de proteínas. Em contrapartida a sequenciação de zonas alvo do genoma, utiliza regiões específicas do genoma (intrões ou/e exões), que têm

como base alguns *locus* específicos ligados a mecanismos de patogenicidade ou resistência conhecidos (8).

No caso dos parasitas, como *Toxoplasma gondii* que tem um genoma com 14 cromossomas e cerca de 65 Mb, WGS requer tecnologias com equipamentos dispendiosos, levando a maioria dos laboratórios a utilizarem apenas zonas específicas do genoma do protozoário (9-12).

Alguns estudos de filogenia e resistência a fármacos antiparasitários têm sido publicados utilizando a tecnologia NGS (9,13), contudo não há qualquer estudo deste género aplicado a estirpes de *Toxoplasma gondii* isoladas em Portugal.

_Objetivo

Este estudo tem como objetivo demonstrar a mais-valia das novas metodologias para a caracterização genética de estirpes de *T. gondii* de origem humana isoladas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 1994 e 2013.

_Material e métodos

Amostra

As amostras utilizadas neste estudo pertencem à coleção de estirpes de *Toxoplasma gondii* do INSA, tendo sido isoladas em humanos entre 1994 e 2013.

Entre 1994 e 2013, foram isoladas 51 estirpes de *T. gondii*, 50 associados à toxoplasmose congénita (CT) e uma proveniente de uma biópsia cerebral (BC) pertencente a um doente com SIDA. Foram ainda estudadas 17 estirpes internacionais de controlo.

PCR, Sanger sequencing and NGS

Foram efetuadas PCR das duas sequências terminais 5' e 3' do gene *Sag2* (genotipagem clássica em I, II, III com base na RFLF), PCR multiplex de 5 microssatélites e PCR em oito zonas alvo (*Sag1*, *Sag2*- sequencias terminais 5' e 3', *Sag3*, CB21-4, M102, L363, PK1, *Gra6*) para proceder à sequenciação (Sanger e NGS) em todos os isolados. Para aplicação da

metodologia de NGS os produtos de PCR de cada isolado foram purificados antes de se proceder à preparação da biblioteca genómica e subsequentemente sequenciados no equipamento MiSeq (Illumina).

_Resultados

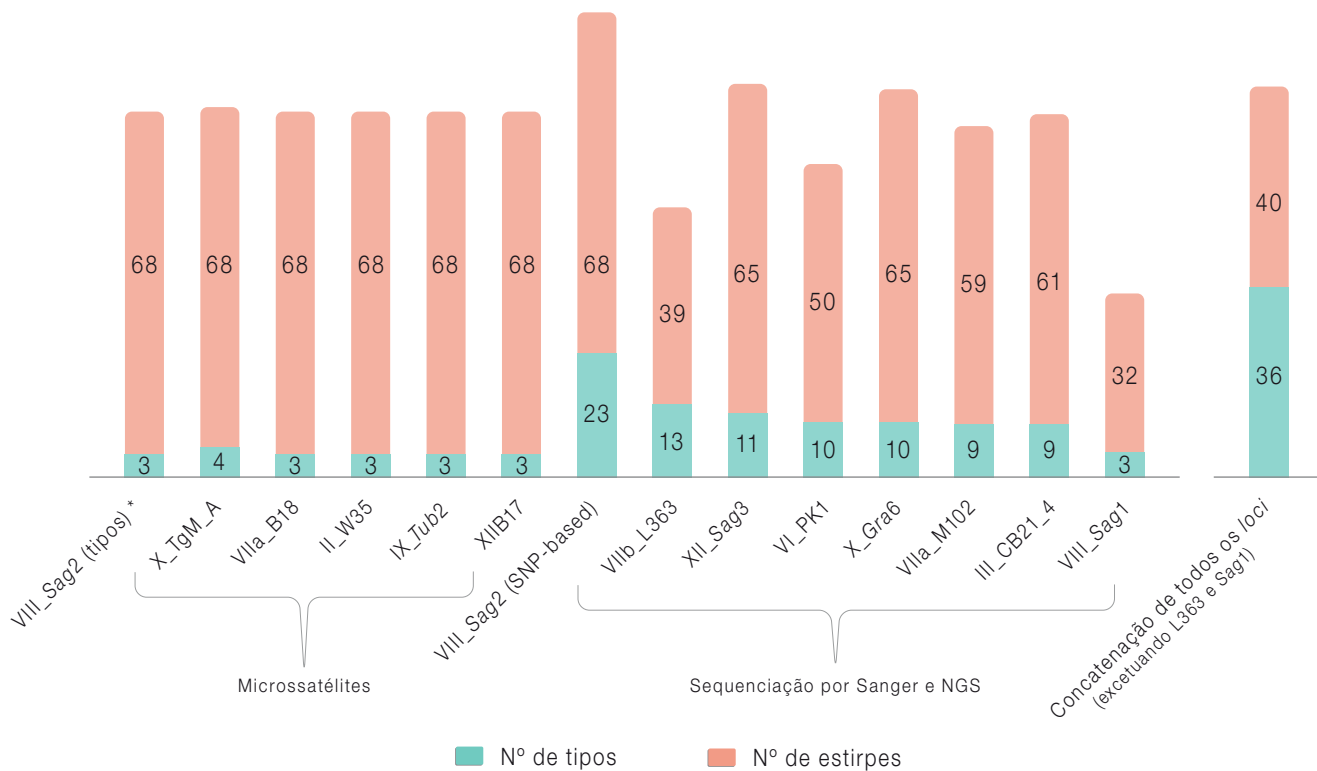
A genotipagem clássica pelo gene *Sag2* (I,II,III) foi conseguida em 100% das amostras, sendo a maioria dos isolados de *Toxoplasma gondii* pertencentes ao tipo II (70,6%; n=36) e os restantes do tipo I (29,4%, n=15) nos isolados de humanos em Portugal. Nestes mesmos isolados não se identificou qualquer estirpe do tipo III.

Através da análise conjunta dos isolados de Portugal e das estirpes de referência foi possível verificar que a introdução da PCR multiplex dos 5 microssatélites não aumentou o poder discriminatório por *locus* (máximo de 4 tipos).

Após a inclusão dos loci para os quais se determinou a sequência nucleotídica (por Sanger e/ou NGS) o poder discriminatório aumentou consideravelmente. De facto, 6 dos 8 *loci* permitiram discriminar mais de 10 tipos, sendo que *Sag2* permitiu identificar 23 tipos entre as 68 estirpes analisadas. É, ainda, de destacar, que em 40 estirpes foi possível obter dados para todos os *loci*, com a exceção do L363 e *Sag1* em que se obteve baixo sucesso de sequenciação. A combinação dos perfis obtidos permitiu diferenciar 36 tipos das 40 estirpes estudadas (gráfico 1).

Para além deste elevado poder discriminatório, esta nova abordagem desvendou perfis recombinantes reveladores de estruturas genéticas mosaico em *T. gondii* (estudo em progresso).

Gráfico 1: Comparação de perfis para os diferentes loci das estirpes de *Toxoplasma gondii* analisadas.



* Sag2 - Classificação clássica (I, II, III) com base na metodologia de RFLP

Discussão e conclusão

Atualmente a metodologia NGS está presente e é indispensável na investigação genómica. A utilização dos dados obtidos por NGS permite a identificação de marcadores em larga escala do genoma completo, bem como a identificação de eventos de recombinação (14). O presente estudo, que constitui a primeira abordagem em Portugal utilizando a técnica NGS aplicada a *T. gondii*, permitiu obter um elevado poder discriminatório relativamente às outras metodologias anteriormente utilizadas, principalmente no que se refere aos fenómenos de recombinação neste parasita (gráfico 1). À semelhança dos avanços da epidemiologia molecular de outras doenças infecciosas estas metodologias permitem uma melhor compreensão do perfil genético das estirpes circulantes em Portugal, com ganho para a vigilância da infeção congénita, para a

possível deteção de surtos (embora raros) e subsequente implementação de medidas de controlo.

Apesar de atualmente a terapêutica utilizada ser independente do genótipo identificado pelo método clássico, não é de descartar que com a revelação de novas relações de fenótipo/genótipo identificadas por esta nova tecnologia, este facto poderá contribuir no futuro para uma melhor adequação da terapêutica quer na infeção congénita, quer nas infeções adquiridas pelos imunodeprimidos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/75154/2010). Agradece-se à Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Su C, Evans D, Cole RH, et al. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*. 2003;299(5605):414-6. <http://science.sciencemag.org/content/299/5605/414.long>
- (2) Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*. 2008;38(11):1257-78.
- (3) Remington G. Schizophrenia, antipsychotics, and the metabolic syndrome: is there a silver lining? *Am J Psychiatry*. 2006;163(7):1132-4.
- (4) Cooper C, Keatley S, Northover A, et al. Next generation sequencing reveals widespread trypanosome diversity and polyparasitism in marsupials from Western Australia. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2018;7(1):58-67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6031965/>
- (5) Wilkinson MJ, Szabo C, Ford CS, et al. Replacing Sanger with Next Generation Sequencing to improve coverage and quality of reference DNA barcodes for plants. *Sci Rep*. 2017;7:46040. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388885/>
- (6) Talundzic E, Plucinski MM, Biliya S, et al. Advanced Molecular Detection of Malarone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3821-3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879379/>
- (7) Paparini A, Yang R, Chen L, et al. Cryptosporidium in fish: alternative sequencing approaches and analyses at multiple loci to resolve mixed infections. *Parasitology*. 2017;144(13):1811-1820.
- (8) McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Nov 26. pii: a036798. [Epub ahead of print]
- (9) Lalremruata A, Jeyaraj S, Engleitner T, et al. Species and genotype diversity of *Plasmodium* in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. *Malar J*. 2017;16(1):398. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627438/>
- (10) Nag S, Dalgaard MD, Kofoed PE, et al. High throughput resistance profiling of *Plasmodium falciparum* infections based on custom dual indexing and Illumina next generation sequencing-technology. *Sci Rep*. 2017;7(1):2398. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445084/>
- (11) Rao PN, Uplekar S, Kayal S, et al. A Method for Amplicon Deep Sequencing of Drug Resistance Genes in *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates from India. *J Clin Microbiol*. 2016;54(6):1500-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879288/>
- (12) Talundzic E, Ndiaye YD, Deme AB, et al. Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* kelch13 Mutations in Senegal Determined by Using Targeted Amplicon Deep Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(3). pii: e02116-16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328579/>
- (13) Talundzic E, Ravishankar S, Kelley J, et al. Next-Generation Sequencing and Bioinformatics Protocol for Malaria Drug Resistance Marker Surveillance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(4). pii: e02474-17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5913988/>
- (14) Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2004;34(10):1185-96.

INSaFLU – uma plataforma bioinformática *online* para análise e comparação do genoma completo do vírus influenza: um contributo pioneiro para o reforço da vigilância da gripe à escala global

INSaFLU – an online bioinformatics platform for genome-scale analysis of influenza virus: an innovative contribution for the worldwide flu surveillance

Vítor Borges¹, Miguel Pinheiro², Pedro Pechirra³, Raquel Guiomar³, João Paulo Gomes¹

vitor.borges@insa.min-saude.pt

(1) Núcleo de Bioinformática, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Instituto de Biomedicina, Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(3) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

A vigilância laboratorial da gripe entrou numa nova era marcada pela análise e caracterização do vírus da gripe à escala do seu genoma completo. Este artigo resume o contexto inerente ao desenvolvimento e à aplicação da plataforma bioinformática *online* INSaFLU ("INSide the FLU") (<https://insaflu.insa.pt/>), a qual consiste na primeira ferramenta bioinformática *online* gratuita especificamente criada para permitir que qualquer laboratório do mundo possa integrar facilmente a análise genoma do vírus na vigilância e investigação da gripe. Este avanço científico constitui um importante alicerce para a operacionalização de uma vigilância à escala global harmonizada pelo uso da sequência do genoma total do vírus da gripe.

_Abstract

A new era of laboratory flu surveillance has already started based on the genome-scale analysis and characterization of the causative agent, the influenza virus. This article summarizes the context behind the development and application of "INSaFLU" ("INSide the FLU") (<https://insaflu.insa.pt/>), which is the first influenza-oriented bioinformatics platform that allows any laboratory in the world to analyze the genome of the influenza virus in a user-friendly manner towards the generation core "genetic requests" for an effective and timely flu laboratory surveillance. INSaFLU supplies public health laboratories and influenza researchers with an open "one size fits all" framework, potentiating the operationalization of a harmonized multi-country WGS-based surveillance for influenza virus.

Comentário resumido do artigo original publicado: Borges V, Pinheiro M, Pechirra P, Guiomar R, Gomes JP. INSaFLU: an automated open web-based bioinformatics suite "from-reads" for influenza whole-genome-sequencing-based surveillance. *Genome Med.* 2018 Jun 29;10(1):46. doi: 10.1186/s13073-018-0555-0. (6)

_Introdução

A gripe representa uma grande preocupação em termos de saúde pública em todo o mundo, causando epidemias sazonais e ocasionalmente pandemias, sendo responsável por elevadas taxas de morbilidade e mortalidade (1, 2).

Iniciou-se recentemente uma nova era na vigilância laboratorial da gripe, a qual assenta na caracterização genética do vírus influenza à escala do seu genoma completo (3-5), o que será crucial para o aumento do conhecimento e inovação em diversas áreas, tais como: i) desenvolvimento de vacinas mais efetivas; ii) identificação de marcadores genéticos associados à resistência a fármacos antivirais; iii) identificação de características genéticas associadas a uma maior virulência e/ou capacidade de transmissão do vírus.

Embora esta transição tecnológica esteja a ser fortemente impulsionada pelas autoridades nacionais e internacionais de saúde, a falta de recursos humanos especializados e/ou de infraestruturas para a análise bioinformática necessária para lidar com a complexidade dos dados primários gerados pela tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS, na sigla em inglês) tem adiado esta transição (3).

_Objetivo

Desenvolvimento de uma plataforma *online* de livre acesso e de fácil utilização para a integração da análise do genoma completo do vírus na vigilância da gripe, obedecendo às reco-

mendações das autoridades de saúde mundiais, no sentido de levar a cabo esta revolução tecnológica para o estudo da gripe.

_Resultados

Neste projeto inovador, desenvolvemos e implementámos a plataforma INSaFLU ("INSide the FLU") (<https://insaflu.insa.pt/>) (6), a qual consiste na primeira ferramenta bioinformática *online* gratuita especificamente criada para processar de um modo automático dados primários ("reads") de NGS, convertendo-os nos *outputs* que são atualmente os principais requisitos genéticos para uma eficaz e atempada vigilância laboratorial da gripe (por exemplo, determinação do tipo e subtipo do vírus influenza, descodificação da sequência do genoma viral, identificação de fenómenos de recombinação, anotações das variantes genéticas e construção de árvores filogenéticas) (figura 1).

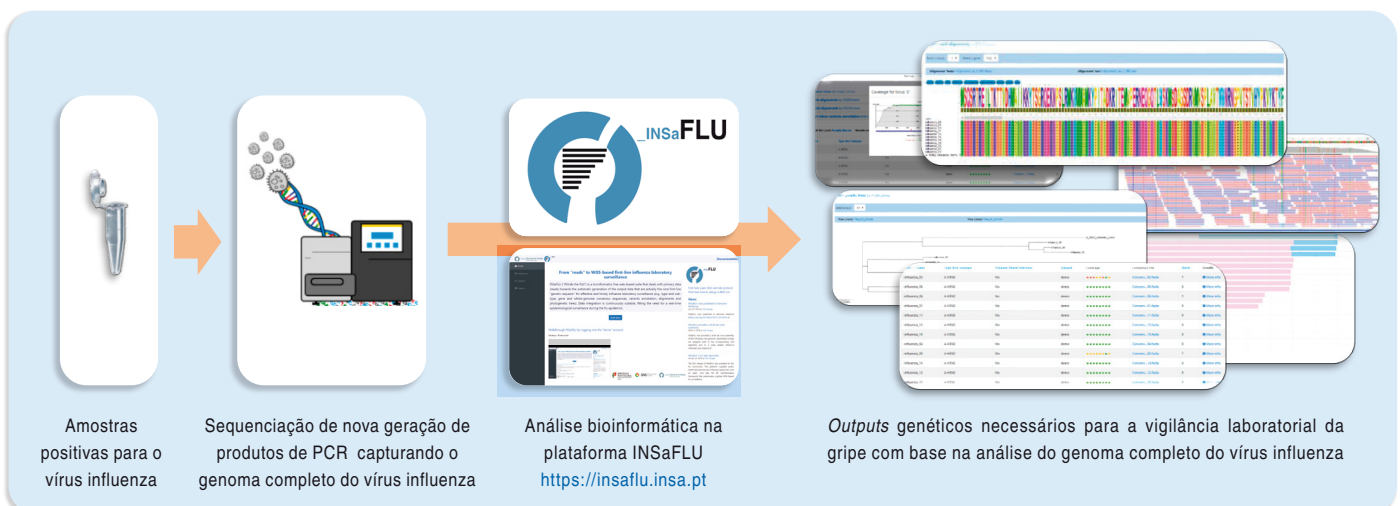
A plataforma INSaFLU, apesar da complexidade inerente à sua construção e implementação, permite que qualquer laboratório a nível mundial realize, de uma forma rápida e simples, análises computacionais complexas, sem necessidade de estudos avançados em bioinformática. Os dados são processados de uma forma confidencial e podem ser integrados de uma forma cumulativa e escalável, o que vem ao encontro da necessidade de uma vigilância epidemiológica contínua durante as epi-

demias e pandemias de gripe. Os vários *outputs* são gerados de forma padronizada e compatível com outros *software* para análises adicionais, facilitando a análise integrada dos perfis genéticos do vírus com os dados epidemiológicos e clínicos associados aos casos de gripe.

Para além dos tradicionais requisitos genéticos acima citados, esta plataforma possibilita também a identificação de potenciais infeções mistas, bem como a deteção de variantes genéticas do vírus dentro do mesmo paciente. Esta dupla abordagem tem o potencial de fortalecer a capacidade dos laboratórios não só para detetar a emergência de variantes antigénicas ou associadas à resistência a fármacos antivirais, como também para descodificar as complexas vias de adaptação do vírus e cadeias de transmissão. É ainda expetável que, num cenário de futura pandemia de gripe, esta ferramenta para análise do genoma completo do vírus desempenhe um papel importante para a identificação dos fenómenos genéticos subjacentes à origem de uma nova variante do vírus influenza.

A plataforma INSaFLU foi apresentada publicamente à comunidade científica internacional, nomeadamente em encontros científicos promovidos pelo projecto iMOVE+ (*Integrated Monitoring of Vaccines in Europe*), e pelo Centro

Figura 1: Esquema simplificado do enquadramento da plataforma INSaFLU no *workflow* da vigilância laboratorial do vírus da gripe na era da sequenciação e análise do seu genoma completo.



Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC, na sigla em inglês) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/385802/who-euro-ecdc-influenza-meeting-rep-eng.pdf?ua=1). Cerca de um ano após a sua disponibilização, a plataforma INSaFLU conta já com utilizadores de instituições académicas e Institutos de Saúde Pública de diversos países, constituindo também a principal ferramenta bioinformática usada pelo Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) para caracterização das variantes genéticas do vírus da gripe circulante em Portugal.

Importa acrescentar que, face à sua versatilidade para análise de dados de NGS obtidos a partir de quaisquer produtos de PCR (“amplificações”), o INSA está já a testar e/ou aplicar esta plataforma bioinformática para investigação e/ou vigilância de outros agentes patogénicos.

_ Conclusão

A plataforma INSaFLU encontra-se disponível para todos os laboratórios à escala mundial, constituindo um importante alicerce para a operacionalização de uma vigilância harmonizada pelo uso da sequência do genoma completo do vírus da gripe.

O artigo científico associado à plataforma INSaFLU foi publicado na revista *Genome Medicine* (6) e pode ser lido em: <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0555-0>.

Agradecimento

À Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Stöhr K. Influenza--WHO cares. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(9):517.
- (2) Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al; Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet.* 2018;391(10127):1285-1300. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2. Epub 2017 Dec 14.
- (3) Ali R, Blackburn RM, Kozlakidis Z. Next-Generation Sequencing and Influenza Virus: a short review of the published implementation attempts. *HAYATI J Biosci.* 2016;23(4):155-9. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.007>
- (4) Revez J, Espinosa L, Albiger B, et al.; ECDC National Microbiology Focal Points and Experts Group. Survey on the Use of Whole-Genome Sequencing for Infectious Diseases Surveillance: rapid expansion of european national capacities, 2015-2016. *Front Public Health.* 2017;5:347. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5741818/>
- (5) Goldstein EJ, Harvey WT, Wilkie GS, et al. Integrating patient and whole-genome sequencing data to provide insights into the epidemiology of seasonal influenza A(H3N2) viruses. *Microb Genom.* 2018;4(1). Epub 2017 Dec 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5857367/>
- (6) Borges V, Pinheiro M, Pechirra P, et al. INSaFLU: an automated open web-based bioinformatics suite "from-reads" for influenza whole-genome-sequencing-based surveillance. *Genome Med.* 2018;10(1):46. doi: 10.1186/s13073-018-0555-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6027769/>

Sequenciação de estirpes de *Clostridium botulinum* tipo B isoladas em Portugal

Sequencing of *Clostridium botulinum* type B strains isolated in Portugal

Margarida Saraiva¹, Teresa Teixeira Lopes¹, António Castro², Cláudia Pena¹, Conceição Costa Bonito¹, Isabel Bastos Moura¹, Isabel Campos Cunha¹, Isabel Sousa¹, Maria Manuel Toscano¹, Maria Antónia Calhau¹

margarida.saraiva@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto/Lisboa, Portugal.

(2) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

_Resumo

O *Clostridium botulinum* é um bacilo Gram-positivo esporulado anaeróbio, produtor de neurotoxinas botulínicas (BoNT) que são causa de botulismo, uma doença neurológica que afeta humanos e animais. Com o objetivo de investigar a relação genética entre estirpes isoladas no decurso da investigação de casos de botulismo que ocorreram em Portugal, o gene codificador da toxina de 8 estirpes de *Clostridium botulinum* neurotoxigénico isoladas no âmbito de 4 casos/surtos foi sequenciado pelo método de Sanger. Os resultados obtidos indicam que todas as estirpes pertencem ao grupo II (não proteolítico) e são produtoras de neurotoxina botulínica (BoNT) B4. A sequência molecular de 7 estirpes é idêntica, sendo de realçar que em todas as estirpes há uma base que diferencia as sequências obtidas da sequência padrão.

_Abstract

Clostridium botulinum is an anaerobic Gram-positive bacillus, producer of botulinum neurotoxins (BoNT) that causes botulism, a neurological disease that affects humans and animals. In order to investigate the genetic relationship between strains isolated during the investigation of botulism cases that occurred in Portugal, the toxin gene from 8 neurotoxicogenic *Clostridium botulinum* strains isolated in the frame of 4 cases/outbreaks was sequenced by the Sanger method. The results indicate that all the strains belong to group II (non-proteolytic) and produce botulinum neurotoxin (BoNT) B4. The sequence of 7 strains is the same, it being noted that in all there is a base which differentiates the sequences obtained from the standard sequence.

_Introdução

O *Clostridium botulinum* é um bacilo Gram-positivo esporulado anaeróbio, produtor de neurotoxinas botulínicas (BoNT) que são causa de botulismo, uma doença neurológica que afeta humanos e animais (1,2). Historicamente, a produção de neurotoxina botulínica constituía o único critério para a nomenclatura das estirpes, sendo todos os clostrídios produtores de neurotoxina botulínica considerados *Clostridium*

botulinum (2,3). Hoje em dia, pelo menos seis bactérias fisiológica e geneticamente distintas são conhecidas por formarem neurotoxinas botulínicas.

As estirpes de *C. botulinum* do Grupo I produzem BoNT/A, BoNT/B e/ou BoNT/F (3), sendo variável o número de genes codificadores de neurotoxinas localizados nos genomas do Grupo I e o número de neurotoxinas produzidas (1-5). Existem estirpes que possuem até três genes codificadores de neurotoxina e produzem uma ou, mais raramente, duas ou três neurotoxinas distintas (1). Estas estirpes são proteolíticas, mesófilas (temperatura mínima de crescimento de 10-12 °C) e os esporos são muito resistentes a temperaturas elevadas (121 °C/3 minutos) (2,4-6). As estirpes de *C. botulinum* do Grupo II (*C. botulinum* não proteolítico) são psicotróficas (temperatura mínima de crescimento de 3 °C) e formam esporos com resistência moderada ao calor (1,4-6). A segurança alimentar associada a alimentos minimamente processados refrigerados, prontos a consumir, com extensos prazos de validade é uma preocupação, uma vez que surtos de botulismo têm estado associados ao abuso nas temperaturas a que são conservados estes produtos (4-6). Estas bactérias formadoras de esporos são ubiqüitárias pelo que, para prevenir o botulismo alimentar é necessário identificar e aplicar medidas de controlo para a destruição dos esporos, ou prevenir a sua germinação, multiplicação celular ou a formação da neurotoxina (1,5,6). A existência de falhas na aplicação de medidas adequadas para destruição dos esporos de *C. botulinum*, ou que impeçam o seu desenvolvimento, durante a produção e/ou durante a conservação de alimentos comercializados ou mesmo na preparação doméstica, pode originar surtos de botulismo (1,4-6).

As estirpes de *C. botulinum* do Grupo II produzem BoNT/B4, BoNT/E ou BoNT/F6. Estas estirpes são conhecidas por não produzirem múltiplas toxinas. No entanto, a sequenciação dos genomas das estirpes BoNT/F6 do Grupo II revelou que contêm genes de neurotoxina do tipo E (3-5). Estão descritos casos de estirpes de *C. botulinum* do Grupo I e II não tóxicas (3-5). Os genes codificadores de neurotoxinas de *C. botulinum* Grupos I e II estão localizados no cromossoma ou num plasmídeo (2-5).

As estirpes de *C. botulinum* do Grupo III são mesófilas e causam botulismo em várias espécies animais. Estas estirpes produzem BoNT/C ou BoNT/D, embora mais frequentemente sejam produzidas as neurotoxinas de BoNT/CD ou BoNT/DC (3).

O *C. botulinum* do Grupo IV (também conhecido como *C. argentinense*) produz BoNT/G, que não foi associada a botulismo humano ou animal (3). Algumas estirpes de *C. baratii* formam neurotoxina do tipo F7 e algumas estirpes de *C. butyricum* formam neurotoxinas do tipo E4 ou E5, estando ambas associadas ao botulismo humano (3).

A vigilância epidemiológica de casos de doença é fulcral para prevenir surtos e a transmissão cruzada de microrganismos. O Despacho n.º 15385-A/2016 (7) atualiza a lista de doenças de notificação obrigatória publicada no Despacho n.º 5681-A/2014 (8) e determina que essas doenças estão sujeitas a notificação clínica e laboratorial obrigatória. Nesse enqua-

dramento, estabelece o botulismo como doença de notificação obrigatória, definindo como critérios epidemiológicos “Pelo menos uma das duas ligações epidemiológicas seguintes: a) Exposição à mesma fonte de infeção de um ou mais casos confirmados (...); b) Exposição a alimentos/água confirmadamente contaminados” (7). A investigação epidemiológica e laboratorial é indispensável para a identificação de “Caso provável Pessoa que preenche os critérios clínicos e epidemiológicos.” e “Caso confirmado Pessoa que preenche os critérios clínicos e laboratoriais”. Por este facto, a comunicação precoce de casos prováveis à autoridade de saúde facilitará a identificação de casos.

_Objetivos

Investigar a relação genética entre estirpes isoladas no decurso da investigação de 4 casos/surtos de botulismo que ocorreram em Portugal e sequenciar o gene da toxina de 8 estirpes de *Clostridium botulinum* neurotoxigénico tipo B, pelo método de Sanger.

_Material e métodos

Em casos de suspeita de botulismo, o Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem capacidade laboratorial para analisar amostras alimentares e amostras biológicas. Os tipos de amostras e as condições de conservação estão indicados no quadro 1.

Quadro 1: ▾ Tipos de amostras e condições de conservação.

▪ Soro para pesquisa de toxina (mínimo: 7 mL)
▪ Fezes para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina (mínimo: 20 g)
▪ Aspirado de ferida para cultura, pesquisa de genes de BoNT e pesquisa de toxina
▪ Biópsia de abcesso para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina
▪ Vômito, lavado gástrico, aspirado gástrico ou conteúdo intestinal, para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina (mínimo: 20 g)
▪ Alimentos suspeitos para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina

Todas as amostras devem ser mantidas refrigeradas após colheita, mas não devem ser congeladas

De 2015 a 2017, em 4 casos/surtos confirmados de botulismo tipo B, o Laboratório de Microbiologia do DAN isolou 8 estirpes de *Clostridium botulinum*, que caracterizou geneticamente (tabela 1).

Tabela 1: Amostras onde se isolaram estirpes de *Clostridium botulinum* por surto/caso confirmado.

Surto/caso confirmado	Ano	Amostras	
		Alimentares	Biológicas
1	2015	Chouriço	---
2	2015	Presunto	Fezes
3	2016	Presunto, alheira, chouriço	---
4	2017	Presunto	Fezes

Após deteção por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), dos genes codificadores de BoNT no meio de enriquecimento Trypticase-Peptide-Glucose-Yeast e/ou Cooked Meat Medium (CM0081, Oxoid), isolou-se a estirpe em Columbia Agar Sangue (bioMérieux). As estirpes foram isoladas de fezes e de alimentos suspeitos de serem a causa da doença, colhidos após inquérito epidemiológico.

Após isolamento das estirpes, efetuou-se a extração de DNA utilizando o QIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen) e a deteção dos genes codificadores de BoNT A, B, E, e F por PCR, de acordo com a Metodologia 1 da ISO/TS 17919 (9). Posteriormente, o produto de PCR obtido com os primers para o gene codificador da BoNT/B foi purificado utilizando ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life-Sciences). Os produtos purificados foram sujeitos a um PCR assimétrico e purificou-se o produto do PCR assimétrico com o kit DyeEx 96 (Quiagen), para obter DNA em condições de ser sequenciado. O produto de PCR purificado foi enviado para a Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana do INSA, onde foi submetido a sequenciação para o gene codificador da toxina, pelo método de Sanger.

Procedeu-se à pesquisa de homologias através da ferramenta informática “Nucleotide BLAST” do U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI).

_Resultados

Os resultados obtidos indicam que todas as amostras correspondem a *Clostridium botulinum* tipo B, tendo todos os produtos de PCR sequenciados a mesma sequência, com exceção da amostra de presunto do surto 3. Esta sequência tem homologia máxima (99%) com as estirpes de *C. botulinum* tipo B: *C. botulinum* strain Templin (Sequence ID: MG545727.1); *C. botulinum* strain IFR_05/025 (Sequence ID: KJ776581.1); *C. botulinum* strain CDC5900 (Sequence ID: KJ776580.1); *C. botulinum* strain CDC3875 (Sequence ID: KJ776578.1).

A estirpe isolada na amostra de presunto do surto 3 apresentou homologia máxima (99%) com a sequência ID: X71343.1 de *C. botulinum* tipo B.

_Conclusões e recomendações

Todas as estirpes pertencem ao grupo II (não proteolítico) BoNT/B4.

A segurança alimentar exige que a toxina botulínica não seja produzida em géneros alimentícios, pelo que se devem adotar procedimentos e estabelecer medidas de controlo que previnam o desenvolvimento de todos os tipos de *Clostridium botulinum*.

O tratamento pelo calor é o método mais utilizado para inibir esporos de bactérias, mas a sua inativação vai depender do binómio tempo/temperatura, do pH, da a_w (atividade da água) e do conteúdo em gordura do alimento (1,6). Têm sido usados aditivos alimentares, como o nitrito de sódio, para impedir o desenvolvimento do *C. botulinum* (1,6). No entanto, uma lenta descida do pH ou da a_w na produção de produtos fermentados, tais como queijos maturados, iogurtes ou carnes fermentadas, pode permitir a ocorrência de condições favoráveis à produção de BoNT (6).

A extensão do tempo de conservação de produtos em refrigeração pode aumentar o risco do desenvolvimento de estirpes não proteolíticas, recomendando-se que as condições que previnem o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* do Grupo II sejam tidas em atenção (quadro 2) (1,6).

Quadro 2: ⚓ Condições que previnem o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* do Grupo II.

Condições	Crescimento
Conservação a temperaturas <3,3 °C	Não se desenvolve
Conservação a temperaturas <5 °C	Não se desenvolve nos primeiros 10 dias
Conservação a temperaturas ente 5-10 °C	Não se desenvolve nos primeiros 5 dias
Aquecimento a 90 °C, durante 10 minutos e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve
pH do género alimentício <5,0 e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve
NaCl >3,5% e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve
a _w 0,97 e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve

Adaptado do Advisory Committee Microbiological Safety of Food (ACMF, 1992) (1).

Torna-se de primordial importância que a população tenha conhecimento que as temperaturas de refrigeração habitualmente utilizadas em frigoríficos domésticos (5-10 °C) não inibem o desenvolvimento do *Clostridium botulinum* (1,6).

Agradecimento:

À Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA, responsável pelos ensaios de sequenciação.

Referências bibliográficas:

- (1) D'Aoust J-Y, Barnes R, Carter M, et al. Food Safety Handbook: Microbiological Challenges. Montreal: bioMérieux, 2007.
- (2) Dahlsten E, Lindström M, Korkeala H. Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in *Clostridium botulinum*. Res Microbiol. 2015;166(4):344-52. Epub 2014 Oct 7.
- (3) Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. Toxins (Basel). 2017;9(1). pii: E38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308270/>
- (4) Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. Res Microbiol. 2015;166(4):303-17. Epub 2014 Nov 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430135/>
- (5) Peck MW, van Vliet AH. Impact of *Clostridium botulinum* genomic diversity on food safety. Curr Opin Food Sci. 2016;10:52-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5181784/>
- (6) Chilled Food Association Lda. Guidelines for Setting Shelf Life of Chilled Foods in Relation to Non-proteolytic *Clostridium botulinum*. 1st ed, July 2018. <https://www.chilledfood.org/wp-content/uploads/2018/07/Non-proteolytic-Clostridium-botulinum-shelf-life-guidance-FINAL-1st-Ed-9-7-18.pdf>
- (7) Despacho n.º 15385-A/2016, 19 de dezembro. DR 2ª Série (1º Supl.) nº 243, 2016-12-21:37142-(2-22). Estabelece as Doenças de Notificação Obrigatória. <https://dre.pt/application/conteudo/105574339>
- (8) Despacho n.º 5681-A/2014, 21 de abril. DR 2ª Série (1º Supl.) nº 82, 2014-04-29:11374-(2-20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. <https://dre.pt/application/file/a/25697650>
- (9) ISO/TS 17919:2013. Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia.

Biofilmes, micobactérias não tuberculosas e infeção

Biofilms, nontuberculous mycobacteria and infection

Maria Bandeira¹, Sigurd Wenner², Magda Ferreira¹, Patricia Almeida Carvalho², Luísa Jordão¹

maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Foundation for Industrial and Technical Research (SINTEF), Trondheim, Noruega

_Resumo

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) são agentes infecciosos emergentes responsáveis por infeções diversas, nomeadamente infeções associadas aos cuidados de saúde. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes por duas MNTs (*M. smegmatis* e *M. chelonae*). Os biofilmes foram caracterizados utilizando microscopia eletrónica e a eficácia de diversos desinfetantes foi avaliada contra MNTs recuperadas de biofilmes. Os resultados obtidos demonstram que as MNTs são capazes de formar biofilmes em materiais presentes em ambiente hospitalar e de resistir à ação de diversos desinfetantes.

_Abstract

*Non-tuberculous mycobacteria (NTMs) are emerging infectious agents responsible for various infections, namely, health-care-associated infections. In this work, biofilms assembly by two NTMs (*M. smegmatis* and *M. chelonae*) was assessed. Biofilms were characterized using electron microscopy and the efficacy of several disinfectants was determined against NTMs recovered from biofilms. The results obtained demonstrate that NTMs are able to assemble biofilms on materials present in a hospital environment and to resist the action of various disinfectants.*

_Introdução

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) são um grupo heterogéneo constituído atualmente por 197 espécies de microrganismos ambientais (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). A sua natureza ubíqua fez com que o seu isolamento de amostras clínicas fosse visto como uma contaminação e/ou colonização não sendo valorizada. A emergência da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana trouxe uma MNT para a ribalta - *M. avium*. Esta MNT era um dos agentes etiológicos de infeções disseminadas nesta população. Atualmente, as MNTs são reconhecidas como agentes etiológicos de infeções diversas incluindo as infeções associadas aos cuidados de saúde (HAIs), que constituem um importante problema de saúde pú-

blica (1,2). Estas bactérias são frequentemente responsáveis pela colonização/infeção do trato respiratório, infeções relacionadas com procedimentos médicos e infeções disseminadas em pacientes imunocomprometidos. Embora *M. avium* continue a ser a MNT mais conhecida, outras MNTs de crescimento rápido, nomeadamente *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, têm vindo a ganhar relevância (3-5).

A transmissão das infeções por MNTs entre humanos carece de demonstração estando estabelecida a transmissão entre uma fonte ambiental e o Homem (6,7). Neste contexto, a presença de MNTs sob a forma de biofilmes em ambiente hospitalar pode constituir um reservatório de infeção para uma população particularmente fragilizada (8,9). A maioria dos microrganismos não vive numa forma isolada (plantónica) mas em comunidades bem organizadas e estruturadas chamadas biofilmes. O biofilme é definido como uma associação de microrganismos aderente a uma superfície biótica ou abiótica, envolvidos por matriz extracelular segregada pelos mesmos constituindo uma estratégia de sobrevivência bem-sucedida (10). Os microrganismos organizados em biofilmes são difíceis de erradicar através dos processos de descontaminação tradicionais, são relativamente resistentes aos desinfetantes, resistentes a antibióticos e são capazes de modular o sistema imunitário do hospedeiro (11). Como tal, as infeções associadas a biofilmes são particularmente difíceis de tratar.

_Objectivo

No presente trabalho, pretendeu-se avaliar a capacidade de duas MNTs de crescimento rápido (*M. chelonae* e *M. smegmatis*) para formar biofilme. O potencial zeta e mobilidade

por deslizamento foram determinadas, bem como a eficácia de vários desinfetantes contra MNTs recuperadas de biofilmes.

Materials e métodos

Micobactérias não tuberculosas

Neste estudo foram utilizadas duas estirpes de referência de MNTs, *M. smegmatis* mc²155 e *M. chelonae* ATCC 35752. As MNTs foram cultivadas em caldo Mueller Hinton (MH) ou em placas de MH agar a 37°C.

Formação de biofilmes

O ensaio de formação de biofilme foi efetuado em placas de 96 poços como descrito anteriormente por Sousa e colegas (12).

Determinação do potencial zeta

Uma alíquota duma cultura em fase exponencial de cada MNT em caldo MH foi centrifugada a 2000rpm por 10 minutos (Megafuge 1.0 Heraeus Instruments). O sobrenadante foi descartado e os sedimentos bacterianos foram fixados com para-formaldeído (PFA) a 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. As bactérias foram lavadas com PBS, centrifugadas e dispersas em água (pH=6,3) de forma a obter densidades óticas a 600nm iguais a 0,4. O potencial zeta foi determinado num Malvern Zetasizer (Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, MALVERN).

Ensaio de mobilidade de MNTs

O ensaio foi efetuado usando meio M63 suplementado com cloreto de magnésio (1mM), glucose (0,2%), casamino acids (0,5%), cloreto ferroso (10µM) solidificado com 0,17% de agar. As colónias de MNTs foram inoculadas no centro da caixa de Petri utilizando um palito estéril. As placas foram seladas com parafilm e incubadas a 37°C até ser visível crescimento (3 dias).

Preparação de amostras para microscopia eletrónica de varrimento (*scanning electron microscopy- SEM*, em inglês)

Em placas de seis poços foram colocados discos de silicone tendo o biofilme sido preparado como descrito acima. Decorridos três dias, o biofilme formado na superfície do meio de cultura foi transferido para outra caixa. Ambos os biofilmes (sobre o silicone e formado na superfície do MH) foram

lavados com água destilada várias vezes de forma a remover os microrganismos não aderentes. A fixação foi efetuada com uma mistura de PFA e glutaraldeído (GTA), pós-fixação com tetróxido de ósmio seguida de desidratação com uma série alcoólica constituída por soluções de etanol em concentrações crescentes (30% de etanol (v/v) a etanol absoluto). As amostras foram transferidas para um porta-amostras onde foi previamente colocada uma fita de carbono de face dupla, colocadas num exsiccador até ficarem completamente secas. A amostra foi então revestida com um filme de carbono e observada num SEM usando o detetor de eletrões secundários.

Elaboração de tomograma de biofilme usando microscopia eletrónica de varrimento de feixe duplo (*focus ion beam scanning electron microscopy- FIB/SEM*, em inglês)

Proceder como descrito anteriormente para SEM (eletrões secundários) até ao final da desidratação (etanol absoluto). Proceder à substituição do etanol por resina (p.e. Epon 812). Incubar a resina a 65°C até que esta polimerize. Colocar a amostra num suporte de SEM e cobrir com uma camada de ouro de 100nm. Introduzir a amostra no FIB/SEM (Helios 64 UX *dual beam*, FEI) e remover fatias da mesma com 30nm de espessura usando uma voltagem de 30 KV e uma intensidade de corrente de 2,4 nA. Adquirir uma micrografia de cada fatia da amostra utilizando uma voltagem de 5 KV, intensidade de 0,1 nA e o detetor de eletrões retrodifundidos. As imagens foram processadas de forma a obter o tomograma utilizando Matlab, Digital Monograph e Avizo.

Determinação da eficácia da atividade dos desinfetantes segundo uma adaptação da norma NF EN 1040:2006

Neste ensaio foram utilizadas MNTs recuperadas por sonicação de biofilmes com três dias de idade formados em caixas de cultura de seis poços. A determinação da eficácia dos desinfetantes foi realizada como preconizado na norma NF EN 1040:2006 (13).

Resultados e discussão

A capacidade de *M. smegmatis* e *M. chelonae* formarem biofilmes foi avaliada. Como se pode observar na [tabela 1](#), o *M. smegmatis* apresenta valores de absorvância superiores aos do *M. chelonae* ao fim de três dias, indicando que é melhor formador de biofilmes. Uma vez que está descrito que o potencial zeta e a mobilidade em meio sólido por deslizamento estão associadas à formação de biofilme, procedemos à sua avaliação [\(14,15\)](#). Quanto menor for o valor de potencial zeta da membrana micobacteriana menor será a capacidade dessa MNT formar biofilme [\(16\)](#). O valor mais elevado de potencial zeta foi observado para *M. smegmatis* ($-39,7 \pm 1,01$ mV- [tabela 1](#)). Este resultado está de acordo com o descrito na literatura. O mesmo foi observado para a mobilidade por deslizamento uma vez que a MNT que exibiu maior mobilidade (*M. smegmatis*) é a melhor formadora de biofilme e vice-versa ([tabela 1](#)). O deslizamento (*sliding*, em inglês) é definido como o mecanismo através do qual uma bactéria é capaz de se espalhar sobre uma superfície sem ação de flagelos [\(15\)](#). No caso das micobactérias existe uma relação diretamente proporcional entre o deslizamento sobre uma superfície e a formação de biofilmes [\(17\)](#). O movimento resulta duma diminuição do atrito devida à interação entre forças geradas no seio da comunidade bacteriana e a superfície sólida sobre a qual se encontram [\(17\)](#).

A presença de biofilmes de microrganismos, potencialmente patogénicos para o Homem, em unidades hospitalares podem

funcionar como reservatórios representando um aumento do risco de infeção. Por esta razão avaliamos a capacidade das MNT formarem biofilme sobre silicone, um material amplamente utilizado como revestimento de utensílios médicos de uso múltiplo não suscetíveis de serem esterilizados por ação do calor húmido. À semelhança do que observamos anteriormente para *K. pneumoniae* [\(18\)](#), também as MNTs foram capazes de formar biofilmes sobre silicone. Na [figura 1A](#) é apresentada uma micrografia representativa dos biofilmes observados para *M. chelonae*. Contudo, as MNTs apresentaram a particularidade de formarem um biofilme na interface ar/líquido, ou seja, na superfície do meio de cultura. Como se pode observar na [figura 1B](#) para *M. chelonae*, o biofilme formado na superfície do meio de cultura é bastante mais compacto do que o biofilme formado sobre o silicone, sendo particularmente rico em matriz extracelular (evidenciada na figura pelas setas azuis). Esta capacidade evidenciada pelas MNTs representa um fator de risco adicional e pode contribuir para a sua propagação através dos sistemas de distribuição de água [\(19\)](#).

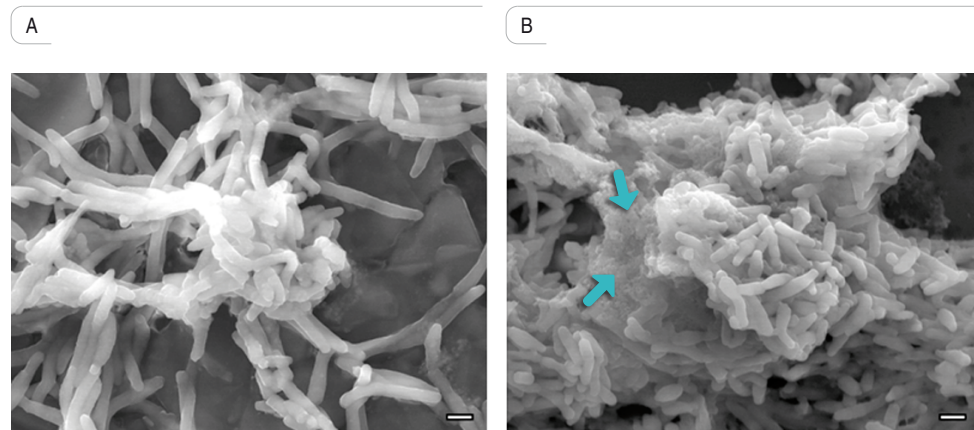
O biofilme de *M. smegmatis* formado na interface ar/líquido é muito semelhante a uma película tendo sido descrito que a mobilidade por deslizamento está envolvida na formação do mesmo [\(20\)](#). Na [figura 2](#) é apresentado um biofilme representativo desta MNT com três dias. Para além duma micrografia obtida por SEM em modo de eletrões secundários [\(2A\)](#) são também apresentadas micrografias obtidas por FIB/SEM em modo de eletrões retrodifundidos [\(2B\)](#) que uma vez integradas originam um tomograma [\(2C\)](#). Esta abordagem permite-nos ter uma estrutura tridimensional do biofilme. Tal permite observar, por exemplo, a existência de canais no interior do biofilme que podem facilitar a circulação de nutrientes ou outras substâncias. A utilização do FIB-SEM permite uma análise mais detalhada e precisa do que a anteriormente utilizada por nós permitindo aumentar o conhecimento sobre a estrutura interna do biofilme [\(12\)](#).

Uma forma de diminuir a possibilidade de infeções será erradicar os biofilmes através da desinfecção das superfícies. Assim, o último passo deste trabalho consistiu na avaliação da eficá-

Tabela 1: Micobactérias não tuberculosas (MNTs): biofilmes e propriedades associadas.

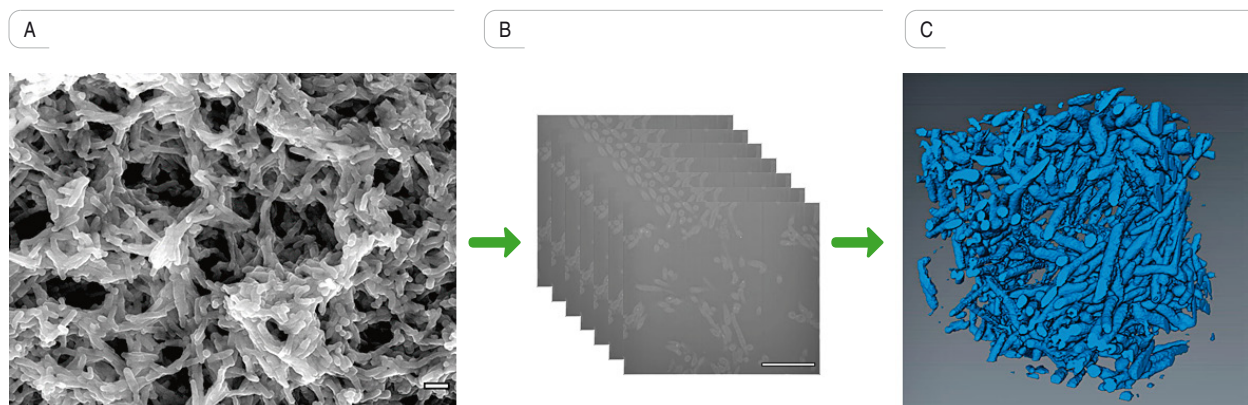
MNT	Biofilme OD 570nm	Potencial zeta (mV)	Mobilidade
<i>M. smegmatis</i>	1,195	$-39,7 \pm 1,01$	
<i>M. chelonae</i>	0.415	$-55,7 \pm 1,58$	

Figura 1: Biofilme de *M. chelonae*.



Micrografia de um biofilme de *M. chelonae*, formado ao fim de três dias, sobre silicone (A) e na interface líquido/ar (B) onde é notório o aumento da matriz extracelular (setas azuis). Barras de escala 1µm.

Figura 2: Biofilme de *M. smegmatis*.



Micrografia de um biofilmes de *M. smegmatis*, formado ao fim de três dias, na interface líquido/ar obtido por SEM utilizando um detetor de eletrões secundários (A), ou eletrões retrofundidos (B) e a reconstrução em 3D (C). Barras de escala na figura A e B são de 1µm e 5µm, respetivamente.

cia de vários desinfetantes (peróxido de hidrogénio- H_2O_2 , hipoclorito de sódio- NaClO, desinfetante à base de glutaraldeído- GTA e desinfetante à base de sais quaternários de amónio- SQA) em MNTs recuperadas de biofilmes (tabela 2). O desinfetante com SQA é eficaz para ambas as espécies independentemente das condições do ensaio, pelo contrário o peróxido de hidrogénio é ineficaz independentemente das condições testadas. Para o NaClO e GTA a eficácia do desinfetante depende do tempo de contacto e/ou concentra-

ção sendo, numa forma geral, o *M. chelonae* mais fácil de erradicar do que o *M. smegmatis*. Estes resultados não são tranquilizadores por diversas razões: (i) os ensaios foram realizados em condições “limpas” que favorecem a atividade do desinfetante, (ii) as MNTs foram recuperadas do biofilme, ou seja, estavam mais acessíveis à ação do desinfetante e (iii) tanto *M. smegmatis* como *M. chelonae* possuem porinas na sua membrana o que facilita a ação do biofilme. Daqui se depreende que não é fácil eliminar biofilmes de MNT.

Tabela 2: Avaliação da eficácia de desinfetantes contra micobactéria não tuberculosa (MNT).

Desinfetante*	Tempo** (min)	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. chelonae</i>
H ₂ O ₂ 3%	5	NE	NE
	15	NE	NE
H ₂ O ₂ 9%	5	NE	NE
	15	NE	NE
NaClO 0,1%	5	NE	NE
	15	NE	NE
NaClO 5%	5	NE	E
	15	NE	E
GTA 0,4%	5	NE	E
	15	E	E
GTA 7%	5	E	E
	15	E	E
SQA 0,2%	5	E	E
	15	E	E
SQA 3,9%	5	E	E
	15	E	E

* Princípio ativo do desinfetante: glutaraldeído (GTA) e sais quaternários de amónio (SQA).

** Tempo de contacto com o desinfetante; NE=não eficaz; E=eficaz

Conclusão

As MNTs têm capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies funcionando como potenciais reservatórios de agentes infecciosos, ou seja, focos de infeção.

O resultado da eficácia de desinfetantes sugere que a melhor estratégia para combater as infeções associadas a biofilmes de MNT é prevenir a formação dos mesmos.

Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012: reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of surgical site infections and prevention indicators in European hospitals - HAI-Net SSI protocol, version 2.2. Stockholm: ECDC, 2017. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/HAI-Net-SSI-protocol-v2.2.pdf>
- (3) Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. Clin Infect Dis. 2001;33(8):1363-74.
- (4) De Groot MA, Huit G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clin Infect Dis. 2006;42(12):1756-63.
- (5) Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C et al.; Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 2013;42(6):1604-13. <http://erj.ersjournals.com/content/42/6/1604.long>
- (6) Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, et al. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. Appl Environ Microbiol. 2002;68(11):5318-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129932/>
- (7) Falkingham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 1996;9(2):177-215. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8964035/>
- (8) Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001;358(9276):135-8.
- (9) Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010;59(3):227-38. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x>
- (10) Niveditha S, Pramodhini S, Umadevi S, et al. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). J Clin Diagn Res. 2012;6(9):1478-82. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3527774/>
- (11) Bryers JD. Medical biofilms. Biotechnol Bioeng. 2008;100(1):1-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706312/>
- (12) Sousa S, Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. Int J Mycobacteriol. 2015;4(1):36-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.11.065/>
- (13) NF EN 1040:2006. Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques - Méthode d'essai et prescriptions (phase 1).
- (14) Tariq M, Bruijs C, Kok J, et al. Link between culture zeta potential homogeneity and Ebp in *Enterococcus faecalis*. Appl Environ Microbiol. 2012;78(7):2282-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302607/>
- (15) Martínez A, Torello S, Kolter R. Sliding motility in mycobacteria. J Bacteriol. 1999;181(23):7331-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC103697/>
- (16) Pang CM, Hong P, Guo H, et al. Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane. Environ Sci Technol. 2005;39(19):7541-50.
- (17) Shi T, Fu T, Xie J. Polyphosphate deficiency affects the sliding motility and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. Curr Microbiol. 2011;63(5):470-6.
- (18) Bandeira M, Borges V, Gomes JP, et al. Insights on *Klebsiella pneumoniae* Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches. Microorganisms. 2017;5(2). pii: E16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5488087/>
- (19) Bordi C, de Bentzmann S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. Ann Intensive Care. 2011;1(1):19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224501/>
- (20) Ojha A, Hatfull GF. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. Mol Microbiol. 2007;66(2):468-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2170428/>

ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Quadrimestral

_ ISSN: 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

_ Numeração: 2ª série

Volume 7, número especial 10, 2018
Doenças Infecciosas

_ Diretor

Fernando de **Almeida**, Presidente do Conselho Diretivo do INSA

_ Editores

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia
Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

_ Conselho Editorial Científico

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia
Luciana **Costa**, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis
Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infecciosas
Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental
Maria João **Silva**, Departamento de Genética Humana
Rita **Batista**, Departamento de Alimentação e Nutrição
Peter **Jordan**, Conselho Científico do INSA

_ Coordenação técnica Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

_ Composição e paginação Francisco **Tellechea**, Biblioteca da Saúde
(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2018.

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.
Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamento 8/99 de 9 de junho artº 12º nº1 a).

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz, 1649-016 **Lisboa, Portugal**

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

E-mail: info@insa.min-saude.pt

www.insa.pt