

Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal

Relatório 2020-2022

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias



Vigilância Laboratorial da Tuberculose

Relatório 2020-2022

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP

Lisboa, março de 2022

Nota introdutória

A Vigilância Laboratorial da Tuberculose (TB) em Portugal, tem tido ao longo dos tempos alguns avanços e recuos, não permitindo, até à data, o estabelecimento de uma rede de vigilância ativa, contínua e representativa do panorama nacional. O primeiro impulso para a sua constituição surgiu na sequência do desenvolvimento do Programa Global da Vigilância da Resistência aos Antibióticos, proposto em 1994 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*) [1]. Em Portugal, este Programa foi iniciado em 2000 sob responsabilidade conjunta do Núcleo de Tuberculose e Doenças Respiratórias da Direção-Geral da Saúde (DGS) e do Laboratório de Tuberculose e Micobactérias do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) [2]. Divulgado pela Circular Normativa nº 9/DT de 29 de maio de 2000 da DGS [3], e funcionando como complemento e em articulação com o SVIG-TB, o sistema de Vigilância da TB da DGS, iniciou-se o VigLab-TB, um sistema de base laboratorial, assente na rede de todos os laboratórios nacionais que, à data, executavam testes de sensibilidade aos antibióticos de 1ª linha. Este sistema de vigilância teve como objetivo inicial conhecer e monitorizar o padrão de resistência das estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) em Portugal e, assim, identificar grupos populacionais, nos quais existe um risco acrescido de transmissão de TB multirresistente (TB-MR). Neste contexto, foram publicados os resultados da atividade da rede VigLab-TB [4] e divulgadas informações periódicas até à sua suspensão em 2006. No dia 23 de março de 2013, e no âmbito das comemorações do Dia Mundial da Tuberculose (I Simpósio de Tuberculose – Perspetiva epidemiológica da tuberculose em Portugal e novos testes de diagnóstico), o INSA reativou o sistema VigLab-TB [5]. Na sua nova versão, este sistema, para além de pretender permitir monitorizar os padrões de resistência das estirpes de MTC que circulavam na região, propunha usar os resultados de genotipagem de todos os isolados de TB-MR com o objetivo de estabelecer possíveis ligações entre estes casos mais graves, e identificar estirpes prevalentes que estariam em circulação em Portugal. Desta colaboração resultou, após uma reunião em novembro de 2016 (II Simpósio de Tuberculose “Redes de Vigilância e Vigilância Laboratorial”) [6], um relatório científico divulgado pelo INSA em nome de toda a rede laboratorial integrante.

Em 2019, e com a disseminação dos métodos de sequenciação genómica de nova geração, o Laboratório de Tuberculose e Micobactérias (atualmente, Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, LNR-TB), implementou metodologias baseadas em sequenciação do genoma total (WGS, *whole genome sequencing*) para efetuar, de forma sistemática e rotineira, a previsão de resistências [7] e vigilância molecular dos casos de TB-MR [8] em articulação com as Autoridades de Saúde. Nos anos subsequentes, e adjuvado pelos anos da pandemia COVID-19, o LNR-TB, embora tenha continuado a sua missão como observatório nacional, não publicou formalmente relatórios, tendo, no entanto, contribuído sempre para a publicação do relatório de monitorização anual da DGS na vertente da vigilância dos casos de TB-MR.

Pretende-se, agora, apresentar um sistema de vigilância mais robusto, com possibilidade de ser alargado a todas as estirpes de MTC isoladas em Portugal e divulgar a informação obtida de uma forma periódica e mais abrangente. Este relatório pretende ser o primeiro de uma série de relatórios de monitorização de padrões/deteção de resistência e proximidade das estirpes de MTC circulantes em Portugal. Desde já assumimos o viés de termos trabalhado apenas as estirpes enviadas e isoladas no LNR-TB durante o período em análise (2020-2022), mas estamos confiantes de ter iniciado um sistema mais dinâmico que contará e será alimentado por todos os laboratórios da rede nacional de laboratórios de TB.

Índice

Nota introdutória	iv
1. Enquadramento	1
2. Resultados	2
2.1. Caracterização da amostragem	2
2.2. Resultados laboratoriais	5
3. Genotipagem	6
4. Considerações finais	11
Referências bibliográficas	12

Índice de Tabelas

Tabela 1 Número de requisições, amostras e utentes enviadas ao LNR-TB durante o período de 01/01/2020 a 31/12/2022	2
Tabela 2 Distribuição do número de utentes por Grupo etário, género e região de Saúde no período de 01/01/2020 a 31/12/2022	4
Tabela 3 Número testes efetuados no LNR-TB por ano	5
Tabela 4 Descrição da amostragem analisada por WGS à data de publicação do presente relatório	7

Índice de Figuras

Figura 1 Distribuição do número de utentes por género e região de Saúde	2
Figura 2 Distribuição do número de utentes por faixa etária e região de Saúde, estudados no LNR-TB no período de 2020-2022	3
Figura 3 Proporção de positivos/negativos dos testes laboratoriais efetuados no LNR-TB por região de Saúde, no período de 2020-2022	5
Figura 4 Filogenia global de todas as estirpes do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sujeitas à sequenciação do genoma total no LNR-TB	8
Figura 5 Filogenia global de todas as estirpes associadas a tuberculose multirresistente sujeitas à sequenciação do genoma total no LNR-TB	9
Figura 6 Análise de clusters genéticos com possíveis relações epidemiológicas contendo estirpes com data de diagnóstico no ano de 2022	10

1. Enquadramento

A TB continua a ser um dos principais problemas de saúde pública mundial. Nos últimos anos devido à pandemia COVID-19, embora se tenha verificado um retrocesso em alguns indicadores, resultado da diminuição do acesso dos doentes aos serviços de saúde e da disrupção dos serviços de saúde, dados da OMS estimam que 10.6 milhões de pessoas adoeceram em 2021, um aumento de 4.5% em relação a 2020. A taxa de incidência (novos casos de TB por 100000 habitantes/ano) teve também um aumento de 3.6% entre 2020 e 2021 [9].

O relatório do ECDC (*European Centre for Disease Control and Prevention*) [10], descreve uma queda acentuada (24%) nos casos notificados de TB (casos novos e reincidentes) entre 2019 e 2020, e aponta a diminuição da detecção e notificação de casos como resultado das medidas sociais e de saúde pública introduzidas pelos países em resposta à pandemia COVID-19. Apesar dos possíveis problemas de subdiagnóstico e subnotificação, em 2020, foram notificados 163602 casos incidentes na região europeia. Os padrões e tendências epidémicas são diversos, com alguns países da União Europeia/Área Económica Europeia aproximando-se dos níveis de baixa incidência (menos de 10 por 100.000 habitantes), enquanto se mantém nove dos 30 países com a maior taxa de TBMR do mundo (Europa oriental e Federação Russa).

Em Portugal, de acordo com o último Relatório da Vigilância e Monitorização da Tuberculose publicado em 2023 pela DGS [11], em 2021, foram notificados 1513 casos de TB, um ligeiro aumento relativo a 2020, ano em que a pandemia chegou ao nosso país, em que foram notificados 1.465 casos. A taxa de incidência (número de novos casos), acompanhou, no entanto, a tendência decrescente, sendo em 2021, de 13,5 por 100 mil habitantes. A mediana de dias até ao diagnóstico manteve a tendência crescente, o que resulta num diagnóstico mais tardio da doença e, conseqüentemente um possível aumento de casos secundários, sendo mais uma vez apontada, como a principal causa do agravamento destes indicadores, a falta de acessibilidade aos cuidados de saúde, em consonância com os dados apresentados pelo ECDC e pela OMS. Os distritos do Porto e de Lisboa mantêm-se como os distritos com maior incidência de TB, com, respetivamente, taxas de notificação de 21,2/100.000, e 23,5/100.000 habitantes.

Em 2021, 75,4% do total de casos confirmados apresentaram resultado de teste de suscetibilidade aos antibacilares de 1ª linha [11]. A resistência à isoniazida em conjunto com outras resistências (qualquer) ou isolada (monoresistência) ocorreu em 5,1% e 2,8% dos casos, respetivamente. Dos 12 casos de TB-MR, 7 (58,3%) eram nascidos em Portugal e 10 casos (83,3%) eram casos sem tratamento prévio para tuberculose, o que indica a existência de transmissão das estirpes resistentes na comunidade. Não se verificou nenhum caso de tuberculose extremamente resistente.

2. Resultados

A confirmação bacteriológica da TB é essencial para a monitorização da doença e para o conhecimento do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, pelo que devem ser sempre solicitadas análises laboratoriais auxiliares ao diagnóstico. De acordo com os dados atuais do relatório da DGS [11], em 2021 foram confirmados (casos de TB com cultura positiva para MTC ou exame direto e teste de amplificação de ácidos nucleicos positivos) 862 casos de TB (57% do número total de casos), 366 casos foram classificados como prováveis (caso de TB exame direto positivo ou teste de amplificação de ácidos nucleicos positivo ou exame anatomopatológico compatível) e 285 (18.7%) casos como possíveis (caso de TB apenas com critérios clínicos e/ou imagiológicos e sem resultados laboratoriais).

2.1. Caracterização da amostragem

Durante o período de 01/01/2020 a 31/12/2022, foram enviadas ao LNR-TB do INSA 10033 requisições clínicas correspondentes a 6986 utentes e 15324 amostras biológicas (Tabela 1).

Tabela 1 | Número de requisições, amostras e utentes enviadas ao LNR-TB durante o período de 01/01/2020 a 31/12/2022.

Ano	# de requisições	# de amostras	# de utentes
2020	3279	4782	2403
2021	3309	5164	2167
2022	3445	5378	2416
TOTAL	10033	15324	6986

As características demográficas e origem geográfica das amostras estão representadas na Tabela 2 e Figuras 1 e 2. Tal como esperado, a maioria dos doentes é do sexo masculino (com uma proporção média M/F de 1,5/1) e a doença ocorre maioritariamente nas faixas etárias entre os 40 e os 65 anos.

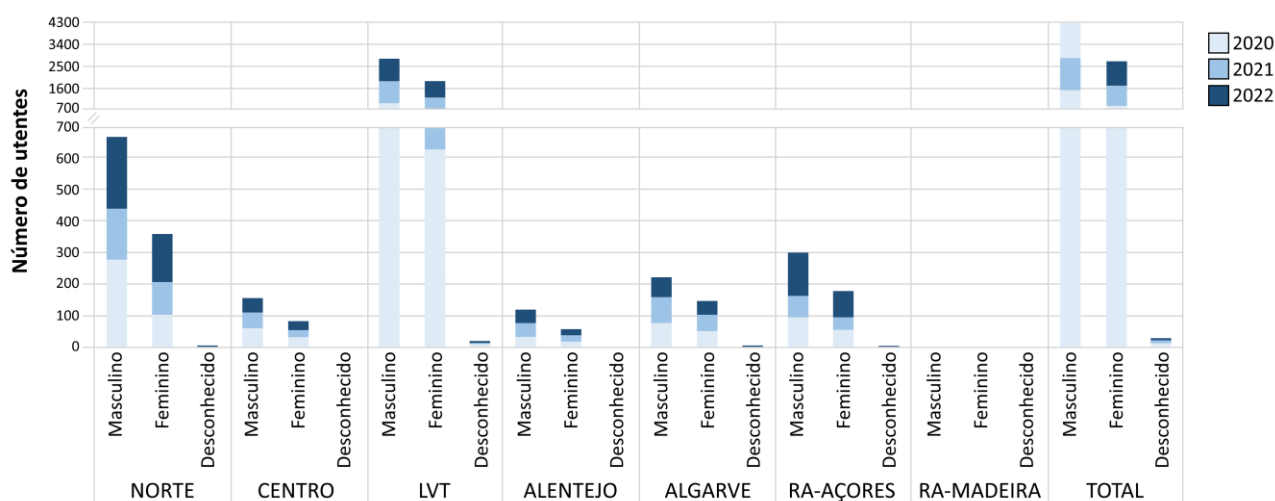
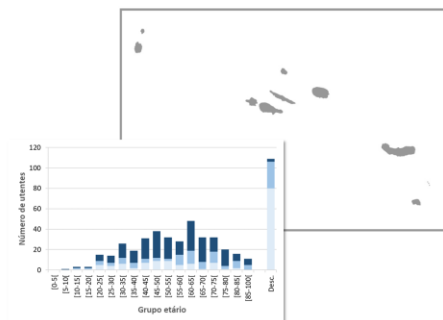
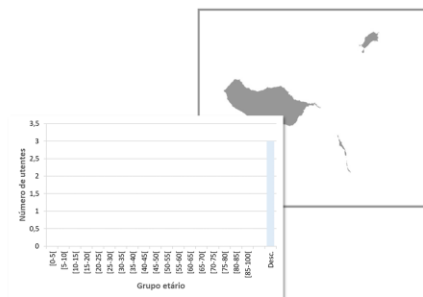


Figura 1 | Distribuição do número de utentes por género e região de Saúde.

RA-AÇORES



RA-MADEIRA



Total Nacional

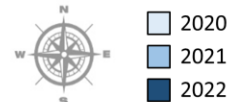
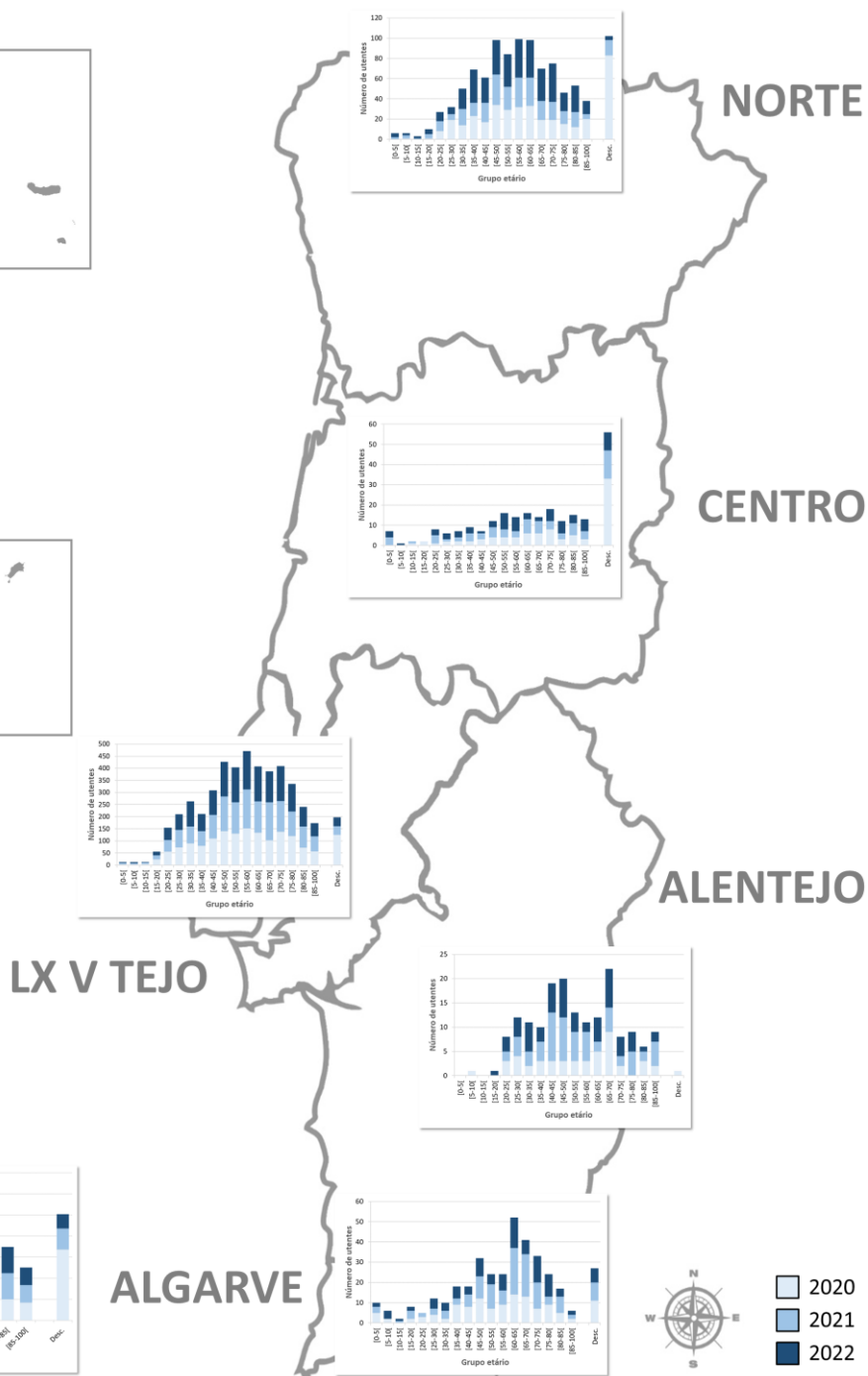
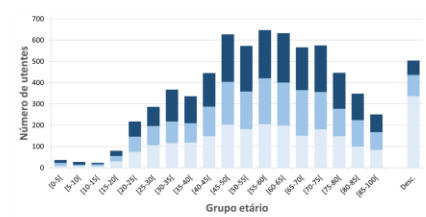


Figura 2 | Distribuição do número de utentes por faixa etária e região de Saúde, estudados no LNR-TB no período de 2020-2022. Desc. – Desconhecido.

Tabela 2 | Distribuição do número de utentes por Grupo etário, género e região de Saúde no período de 01/01/2020 a 31/12/2022.

Grupo etário	Género	Região de Saúde							TOTAL
		LVT	NORTE	CENTRO	ALENTEJO	ALGARVE	RA-AÇORES	RA-MADEIRA	
[0-5[M	9	2	5	0	7	0	0	23
	F	4	4	2	0	3	0	0	13
[5-10[M	4	3	0	1	3	0	0	11
	F	8	3	1	0	3	1	0	16
[10-15[M	7	0	1	0	1	2	0	11
	F	6	2	1	0	1	1	0	11
	Desc.	0	1	0	0	0	0	0	1
[15-20[M	30	5	2	1	5	3	0	46
	F	26	5	0	0	3	0	0	34
[20-25[M	84	17	5	5	2	9	0	122
	F	69	10	3	3	3	6	0	94
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[25-30[M	127	19	5	9	6	10	0	176
	F	79	13	1	3	6	4	0	106
	Desc.	4	0	0	0	0	0	0	4
[30-35[M	152	36	3	9	5	13	0	218
	F	110	14	4	2	5	12	0	147
	Desc.	1	0	0	0	0	1	0	2
[35-40[M	112	40	7	5	9	15	0	188
	F	99	29	2	5	9	4	0	148
[40-45[M	173	40	6	14	10	21	0	264
	F	135	21	1	5	8	10	0	180
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[45-50[M	270	64	9	15	19	26	0	403
	F	156	34	3	5	13	12	0	223
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[50-55[M	248	59	11	9	15	20	0	362
	F	155	25	5	4	9	12	0	210
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[55-60[M	284	66	9	5	13	18	0	395
	F	186	33	5	6	11	10	0	251
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[60-65[M	243	63	9	7	34	33	0	389
	F	164	35	7	5	18	15	0	244
[65-70[M	225	51	9	15	27	22	0	349
	F	162	19	5	7	14	10	0	217
[70-75[M	252	48	8	5	20	19	0	352
	F	157	27	10	3	13	13	0	223
[75-80[M	214	23	8	5	14	9	0	273
	F	121	23	4	4	10	11	0	173
[80-85[M	141	26	10	5	13	9	0	204
	F	99	27	5	1	4	7	0	143
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[85-100[M	96	23	8	7	5	6	0	145
	F	77	15	5	2	1	5	0	105
Desc.	M	120	82	39	1	13	64	3	322
	F	70	19	16	0	11	43	0	159
	Desc.	7	1	1	0	3	2	0	14
Total de utentes por região		LVT	NORTE	CENTRO	ALENTEJO	ALGARVE	RA-AÇORES	RA-MADEIRA	
		4692	1027	235	173	369	478	3	

M – Masculino; F – Feminino; Desc. – Desconhecido; LVT – Lisboa e Vale do Tejo; RA – Região Autónoma

2.2. Resultados laboratoriais

Durante o período em análise, o LNR-TB realizou um total de 10557 análises (pesquisa de BAAR, bacilos álcool-ácido resistentes; isolamento em cultura em meio sólido e líquido; pesquisas moleculares; identificação de culturas; testes de suscetibilidade a antibióticos, TSA) em 15324 amostras biológicas/estirpes. Globalmente obteve-se uma taxa de positividade por utente de ~30% por ano (Tabela 3). Na Figura 3, apresenta-se a proporção de resultados positivos e negativos por utente, ano de diagnóstico e região de saúde para as principais metodologias analíticas efetuadas por rotina para diagnóstico de TB. Como se pode verificar, analisando os dados globais nacionais, a taxa de positividade mantém-se relativamente constante durante os anos em análise, com 7,3% de resultados positivos para BAAR, 15,3% de PCR positivos para MTC, 9,6% de isolamentos de MTC em culturas em meio líquido e 8,2% de isolamentos em culturas em meio sólido (Figura 3 e Tabela 3).

Tabela 3 | Número testes efetuados no LNR-TB por ano.

Ano	Pesquisa de BAAR (#pos/#testes)	PCR (#pos/#testes)	Cultura em meio líquido (#pos/#testes)	Cultura em meio sólido (#pos/#testes)	ID complexo <i>M. tuberculosis</i> (#pos/#testes)	TSA (#testes)	Total de Positivos / total de utentes
2020	104 / 1440 (7,2%)	168 / 1026 (16,4%)	73 / 916 (8,0%)	85 / 1432 (5,9%)	392 / 433 (90,5%)	259	541 / 2403 (22,5%)
2021	117 / 1415 (8,3%)	204 / 1260 (16,2%)	134 / 1138 (11,8%)	136 / 1410 (9,7%)	385 / 392 (98,2%)	241	563 / 2167 (26,0%)
2022	111 / 1696 (6,5%)	169 / 1248 (13,5%)	124 / 1386 (9,0%)	148 / 1682 (8,8%)	386 / 398 (97,0%)	247	507 / 2416 (21,0%)
TOTAL	332 / 4551 (7,3%)	541 / 3534 (15,3%)	331 / 3440 (9,6%)	369 / 4524 (8,2%)	1163 / 1223 (95,1%)	747	1611 / 6986 (23,1%)

Os valores entre parênteses correspondem à percentagem de testes positivos. BAAR – bacilos álcool-ácido resistentes; PCR – teste de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN); ID – identificação; TSA – teste de suscetibilidade aos antibacilares.

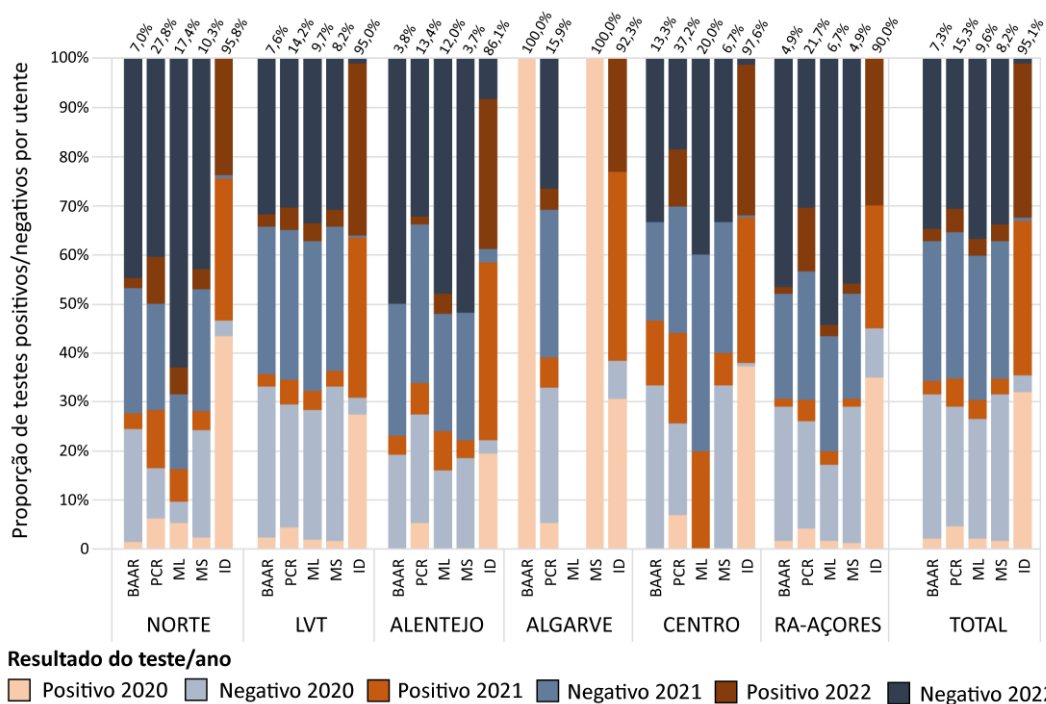


Figura 3 | Proporção de positivos/negativos dos testes laboratoriais efetuados no NLR-TB por região de Saúde, no período de 2020-2022. Os valores percentuais acima de cada barra correspondem ao total de positivos por teste no período em estudo. A região da Madeira não se encontra representada no gráfico por apresentar apenas 3 pedidos de análise para identificação de micobactérias não tuberculosas. BAAR – bacilos álcool-ácido resistentes; PCR – teste de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN); ML – cultura em meio líquido; MS – cultura em meio sólido; ID – identificação do complexo *M. tuberculosis*.

3. Genotipagem

No decorrer de 2016, o INSA deu início a um processo de transição metodológica de genotipagem de estirpes de MTC. Metodologias baseadas na análise de MIRU-VNTR (*Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat*) foram gradualmente sendo substituídas por tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS – *Next-generation sequencing*), nomeadamente a sequenciação do genoma total (WGS – *whole genome sequencing*). Esta transição permitiu aumentar a sensibilidade das metodologias laboratoriais de vigilância molecular das estirpes de MTC, uma vez que, atualmente, a genotipagem de MTC tira partido de informação à escala do genoma [8]. Tendo em conta as inúmeras vantagens do WGS, e tendo como principal objetivo uma vigilância robusta e integrada dos casos de TB-MR, procedemos a uma análise retrospectiva de todas as estirpes de MTC resistentes desde 2013. Adicionalmente, esta metodologia permite extrair, em paralelo, dados genéticos associados à previsão de resistência aos antibióticos, tanto de 1ª como de 2ª linha [7]. Desta forma, uma única análise permite, simultaneamente, fornecer, de forma mais rápida e alargada, resultados de possíveis resistências aos Clínicos e sinalizar potenciais relações filogenéticas entre estirpes (i.e., possíveis casos de transmissão, surtos, clusters ou cadeias de transmissão ao longo do tempo) às Autoridades de Saúde. Esta abordagem é realizada no LNR-TB de forma rotineira desde 2019 para todos os casos de TB-MR, sendo que, a partir de 2023, o LNR-TB pretende que o seu uso seja alargado para incluir as amostras de todos os casos de TB enviadas para diagnóstico.

Neste contexto, a amostragem aqui apresentada (N=516) inclui todas as estirpes de TB-MR de 2013 a 2022, estirpes analisadas em contextos de projetos de investigação, estirpes enviadas para investigação de potenciais surtos ou casos de transmissão e todas as estirpes de 2022 enviadas ao LNR-TB para o diagnóstico de confirmação do caso de TB. Na Tabela 4 apresenta-se uma descrição sumária das características demográficas dos doentes e resultados microbiológicos das estirpes analisadas, e na Figura 4 apresenta-se a filogenia global desta amostragem. Espelhando os dados laboratoriais do LNR-TB, também este *dataset* se encontra enriquecido de estirpes provenientes de doentes do género Masculino (70,0%), nas faixas etárias dos 40 aos 60 anos (46,1%) e residentes na Área Metropolitana de Lisboa (63,8%). Relativamente aos perfis de resistência/suscetibilidade aos antibióticos, 43,4% das estirpes apresentam no mínimo uma resistência.

Tabela 4 | Descrição da amostragem analisada por WGS à data de publicação do presente relatório.

	Ano de diagnóstico											Total
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	
Género												
M	3	9	74	22	22	21	26	36	14	12	122	361
F	1	4	35	3	7	10	13	11	9	3	59	155
Grupo etário												
[0-5[0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	3
[10-15[0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3
[15-20[0	1	1	0	1	0	1	3	0	0	2	9
[20-25[0	2	6	1	4	1	2	1	2	1	7	27
[25-30[1	1	4	2	1	1	1	3	1	1	11	27
[30-35[0	2	6	1	0	3	2	4	1	1	16	36
[35-40[0	1	12	3	2	2	3	3	1	1	8	36
[40-45[0	3	20	5	7	1	6	5	6	0	16	69
[45-50[1	1	19	0	3	1	1	6	2	3	27	64
[50-55[0	2	12	4	5	4	2	4	2	2	18	55
[55-60[0	0	7	4	1	6	5	3	5	0	19	50
[60-65[1	0	5	2	3	2	3	0	0	3	19	38
[65-70[0	0	7	0	1	0	2	2	0	0	10	22
[70-75[0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	10	17
[75-80[0	0	3	1	0	0	0	3	0	0	4	11
[80-85[0	0	4	0	0	0	2	1	0	0	5	12
[85-100]	0	0	1	0	0	2	2	1	0	1	5	12
Desc.	1	0	2	2	0	5	2	6	2	1	4	25
Região de Residência												
Alentejo	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	12	14
Algarve	0	0	0	1	0	0	0	1	3	0	2	7
AML	0	8	97	13	14	12	14	17	14	7	133	329
Centro	0	1	3	1	4	0	3	9	0	4	22	47
Norte	4	4	9	9	11	18	21	19	5	4	6	110
RA-Madeira	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	3
RA-Açores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6
Perfil de resistência												
MDR-TB	0	8	17	16	14	8	8	6	11	7	7	102
Pré-XDR-TB	0	5	4	3	3	3	12	1	5	4	1	41
RR-TB	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	2	7
HR-TB	0	0	9	0	1	6	0	4	5	1	18	44
Outros	0	0	10	0	2	0	1	2	0	0	15	30
Sensível	4	0	69	6	9	14	18	30	2	2	138	292

M – Masculino; F – Feminino; Desc. – Desconhecido; AML – Área metropolitana de Lisboa; RA – Região Autónoma; MDR-TB – Tuberculose multirresistente; Pré-XDR-TB – Tuberculose pré-extensivamente resistente; RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina; HR-TB – Tuberculose resistente à isoniazida; Outros – estirpe de MTC com qualquer resistência além das descritas.

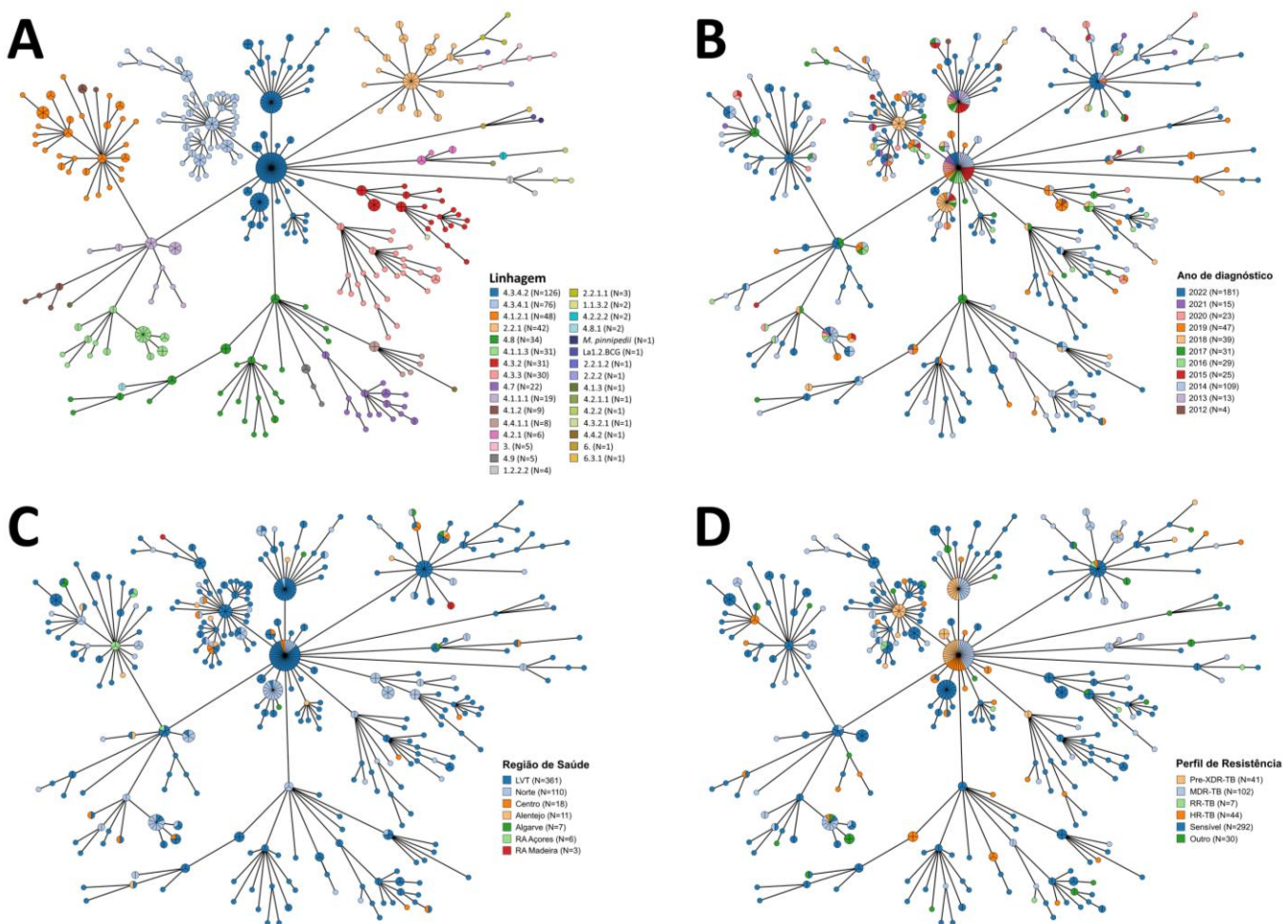


Figura 4 | Filogenia global de todas as estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* sujeitas à sequenciação do genoma total no LNR-TB (N=516). A árvore filogenética (MST, *minimum spanning tree*) foi gerada a partir dos sítios variáveis (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) partilhados por todas as estirpes em relação ao genoma de referência de *M. tuberculosis* H37Rv (N=24052 posições). Cada nó da árvore corresponde a uma ou a um conjunto de estirpes, estando destacado por cores (A) as diferentes linhagens, (B) o ano de diagnóstico, (C) a região de Saúde e (D) o perfil de resistência observado. Para efeitos de visualização, todas as estirpes que apresentam uma distancia até 24 SNPs foram colapsadas num mesmo nó da árvore, de forma a destacar clusters genéticos. LVT – Lisboa e Vale do Tejo; RA – Região Autónoma; MDR-TB – Tuberculose multirresistente; Pré-XDR-TB – Tuberculose pré-extensivamente resistente; RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina; HR-TB – Tuberculose resistente à isoniazida; Outros – Tuberculose com qualquer resistência além das descritas.

Na Figura 5 destacam-se as relações filogenéticas entre todas estirpes associadas a casos de TB-MR (N=150). Maioritariamente, as estirpes pertencem à linhagem 4 (82,7%), em particular às sub-linhagens 4.3.4.2. (36,0%) e 4.3.4.1 (16,0%), seguido da linhagem 2 (14,7%) (Figura 4A e 4D). De acordo com a nova definição da OMS [12], desde 2013 que não é diagnosticado nenhum caso de XDR-TB em Portugal. No entanto, continuamos com casos resistentes à maioria dos grupos de antibióticos usados no tratamento de 2ª linha (Figura 5B), nomeadamente às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos em simultâneo (13,3%), que classificariam os casos como XDR de acordo com a definição antiga. Verifica-se uma tendência decrescente no número de casos de TB-MR, com uma redução média de 2%/ano de 2013 para 2022. A maioria dos casos de TB-MR (58,7%) ocorre na região de LVT, seguido da região Norte (20,7%). Destaca-se a existência de quatro grandes clusters moleculares (constituídos por sete a 19 estirpes) que incluem doentes com características demográficas variadas e estirpes

com diferentes perfis de resistência. É importante reforçar a necessidade de relacionar os dados moleculares com links epidemiológicos entre os doentes, de forma a excluir possíveis eventos de transmissão (que estariam, em alguns casos, a acontecer desde 2013) ou se se tratam efetivamente de estirpes de MTC multirresistentes persistentes.

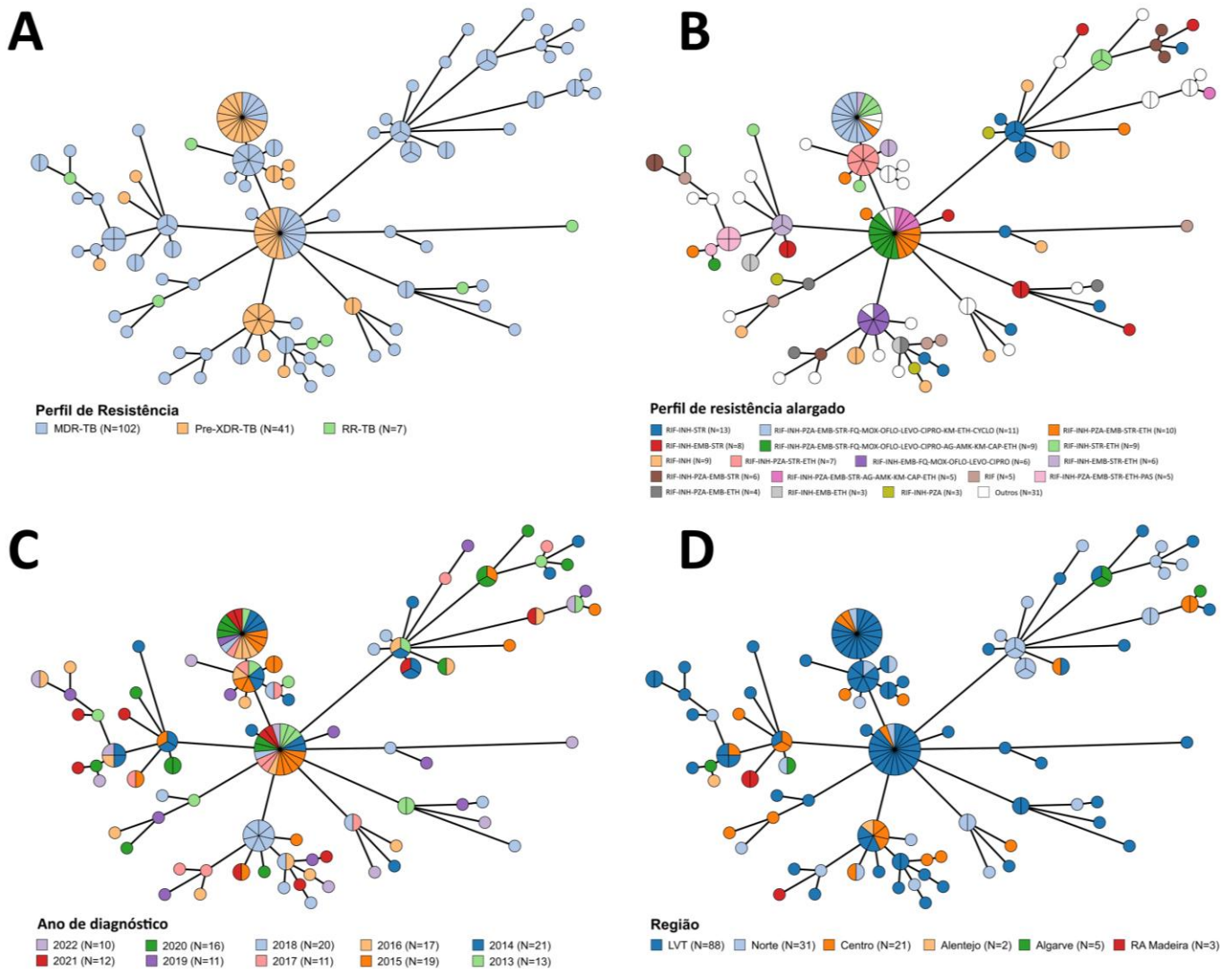


Figura 5 | Filogenia global de todas as estirpes associadas a tuberculose multirresistente sujeitas à sequenciação do genoma total no LNR-TB (N=150). A árvore filogenética (MST, *minimum spanning tree*) foi gerada a partir dos sítios variáveis (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) partilhados por todas as estirpes em relação ao genoma de referência de *M. tuberculosis* H37Rv (N=9046 posições). Cada nó da árvore corresponde a uma ou a um conjunto de estirpes, estando destacado por cores (A) o perfil de resistência observado, (B) perfil de resistência alargado, (C) o ano de diagnóstico e (D) a região de residência de cada um dos doentes. Para efeitos de visualização, todas as estirpes que apresentam uma distância até 12 SNPs foram colapsadas num mesmo nó da árvore, de forma a destacar clusters genéticos com possíveis relações epidemiológicas. LVT – Lisboa e Vale do Tejo; RA – Região Autónoma; MDR-TB – Tuberculose multirresistente; Pré-XDR-TB – Tuberculose pré-extensivamente resistente; RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina; STR – estreptomicina; INH – isoniazida; RIF – rifampicina; EMB – etambutol; PZA – pirazinamida; FQ – fluoroquinolonas; MOX – moxifloxacina; OFLO – ofloxacina; LEVO – levofloxacina; CIPRO – ciprofloxacina; AG – aminoglicosídeos; AMK – amicacina; KM – canamicina; CAP – capreomicina; ETH – etionamida; PAS – ácido para-amino salicílico. CYCLO – cicloserina. Outros – outros perfis de resistência MDR.

Para cumprir os objetivos de alargar a vigilância molecular a todos os casos de TB (sensíveis e resistentes) que circulam em Portugal, procedemos a uma análise de possíveis relações filogenéticas de todas as estirpes de MTC isoladas no LNR-TB em 2022, num contexto de confirmação diagnóstica inicial do caso de TB. Foram identificados 35 clusters moleculares cujas principais características se encontram descritas na Figura 6. Embora alguns destes clusters, com menor numero de casos (Figura 6B, clusters 16, 17, 18, 21, 26, 27, 28, 31, 33, 34 e 35), tenham surgido apenas em 2022, existem clusters que remontam a 2013 (Figura 6B, clusters 10 e 14) verificando-se, por isso, uma grande diversidade de possíveis contextos epidemiológicos ao longo dos anos (intervalo de tempo desde o primeiro e o último caso entre zero e 3375 dias, Figura 6B) que seria importante esclarecer. Uma vez mais, é fundamental que a análise destes dados seja suportada por informação epidemiológica que ajude a clarificar se estamos perante cadeias de transmissão efetivas ou de persistência de determinadas linhagens de estirpes em circulação.

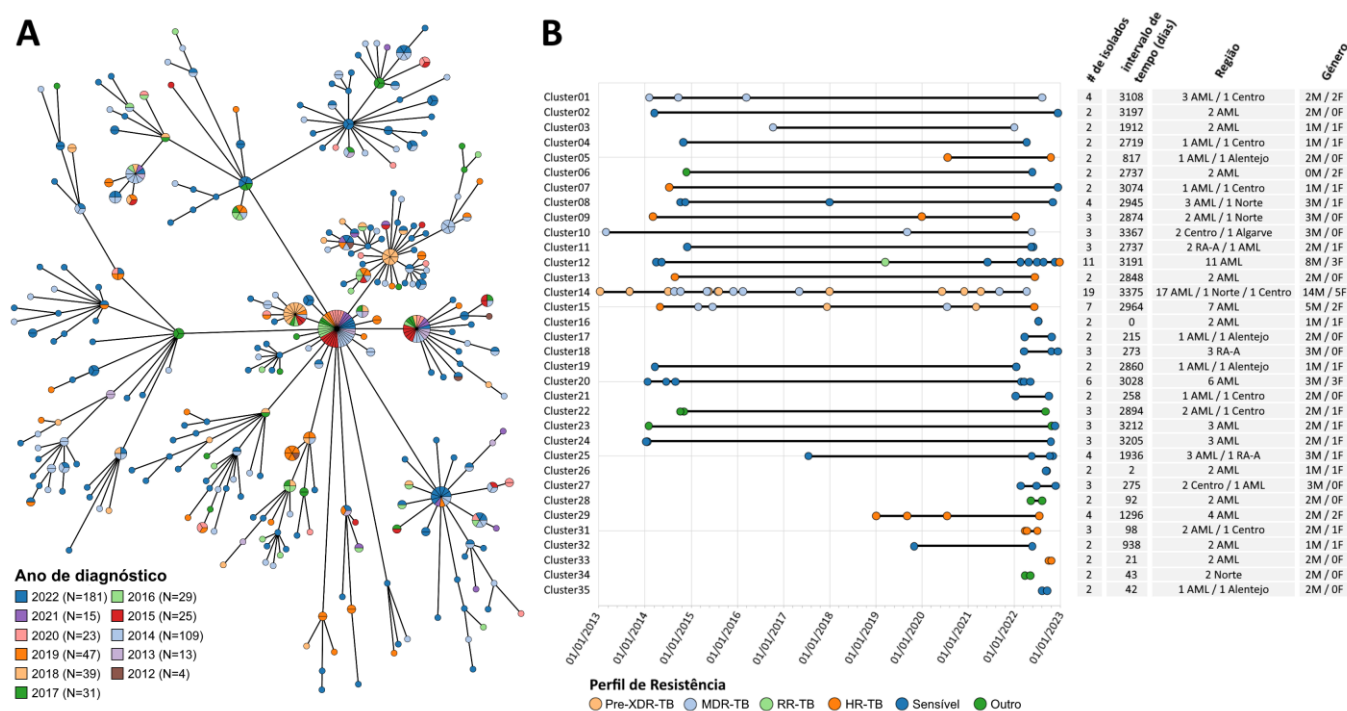


Figura 6 | Análise de clusters genéticos com possíveis relações epidemiológicas contendo estirpes com data de diagnóstico no ano de 2022. **(A)** Árvore filogenética global (MST, *minimum spanning tree*) de todas as estirpes sujeitas à sequenciação do genoma total no LNR-TB coloridas por ano de diagnóstico. **(B)** Distribuição temporal dos clusters com potencial relação epidemiológica, envolvendo estirpes de 2022, com destaque para os perfis de resistência, região de ocorrência e género do doente. M – Masculino; F – Feminino; AML – Área metropolitana de Lisboa; RA-A – Região Autónoma dos Açores; MDR-TB – Tuberculose multirresistente; Pré-XDR-TB – Tuberculose pré-extensivamente resistente; RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina; HR-TB – Tuberculose resistente à isoniazida; Outros – Tuberculose com qualquer resistência além das descritas.

4. Considerações finais

Apesar de ser uma doença de notificação obrigatória, de base clínica, a confirmação bacteriológica da TB é essencial para a monitorização da doença e para o conhecimento do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, pelo que devem ser sempre solicitadas análises laboratoriais auxiliares e que permitam a confirmação diagnóstica.

A transição metodológica da genotipagem de estirpes de MTC para tecnologias de sequenciação de nova geração permitiu aumentar a sensibilidade das metodologias de análise molecular e assim fazer uma vigilância laboratorial mais robusta e integrada dos casos de TB-MR. O LNR-TB tem agora como objetivo que esta abordagem, realizada de forma rotineira desde 2019 para diagnóstico de resistência e deteção de relações filogenéticas entre as estirpes em todos os casos de TB-MR, seja alargada, a partir de 2023, a todas as amostras de todos os casos de TB enviadas para diagnóstico. Para permitir que este objetivo seja cumprido de forma efetiva, é fundamental não só otimizar a rede de laboratórios de TB, através da sistematização de envio, em tempo real, dos dados e das estirpes isoladas, como reforçar a colaboração com as Autoridades de Saúde de forma a validar epidemiologicamente as relações genómicas detetadas. Tendo em conta que, para além de permitir a deteção atempada de possíveis casos de transmissão que estejam a acontecer na comunidade, esta abordagem também permite conhecer um perfil de suscetibilidade completo aos antibacilares, prevemos que num futuro bastante próximo possamos alterar metodologias diagnósticas convencionais garantido uma redução de custos, otimização de recursos e uma garantia de qualidade dos dados gerados por esta estrutura completa de análise (laboratorial, clínica e epidemiológica).

Referências bibliográficas

- [1] World Health Organization Tuberculosis Programme and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. 1994. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Document WHO/TB/94.178, Geneva, 1994.
- [2] Antunes ML, Aleixo-Dias J, Antunes AF, Pereira M, Raymundo E, Rodrigues M. 2000. Antituberculosis drug resistance in Portugal. *The international journal of tuberculosis and lung disease* 4: 223-231
- [3] Direcção-Geral de Saúde. 2003. Resistência aos antibióticos em Tuberculose. Circular Normativa nº 9/DT de 29 de Maio de 2000
- [4] Furtado C, Brum L. (em nome da Rede Nacional de Vigilância da Resistência aos Antibacilares-VigLab-Tuberculose). 2003. Vigilância Laboratorial da Resistência aos Antibacilares em Portugal em 2000 e 2001. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 9: 279-291
- [5] Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal: relatório 2012. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, 2013.
- [6] II Simpósio de Tuberculose “Redes de Vigilância e Vigilância Laboratorial”. 2016. <https://www.insa.min-saude.pt/ii-simposio-de-tuberculose-redes-de-vigilancia-e-vigilancia-laboratorial/>
- [7] Macedo R, Nunes A, Portugal I, Duarte S, Vieira L, Gomes JP. Dissecting whole-genome sequencing-based online tools for predicting resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: can we use them for clinical decision guidance? *Tuberculosis (Edinb)*. 2018 May; 110:44-51.
- [8] Macedo R, Pinto M, Borges V, Nunes A, Oliveira O, Portugal I, Duarte R, Gomes JP. Evaluation of a gene-by-gene approach for prospective whole-genome sequencing-based surveillance of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2019, Volume 115, Pages 81-88.
- [9] Global Tuberculosis Report 2022. World Health Organization. 2022. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>
- [10] European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe and Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2022.
- [11] Direcção-Geral da Saúde. Relatório da Vigilância e Monitorização da Tuberculose em Portugal: dados definitivos de 2021. Programa Nacional para a Tuberculose, março 2023.
- [12] Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27-29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021. CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Departamento de Doenças Infecciosas

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal
Tel.: (+351) 217 519 200
E-mail: ddi@insa.min-saude.pt

Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira
Rua Alexandre Herculano, n. 321 4000-055 Porto, Portugal
Tel.: (+351) 223 401 190
E-mail: inforporto@insa.min

Centro de Estudos de Vectores de Doenças Infecciosas
Doutor Francisco Cambournac
Av. da Liberdade, n.5 2965-575 Águas de Moura, Portugal
Tel.: (+351) 265 938 290
E-mail: cevdi@insa.min