

_título:

Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal

_subtítulo:

Relatório 2023

_edição:

INSA, IP

_autores: _Departamento de Doenças Infecciosas

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias

_local / data:

Lisboa

março 2024



Catálogo na publicação:

PORTUGAL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP
Vigilância laboratorial da tuberculose em Portugal : relatório 2023 / Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias -
Lisboa : INSA, IP, 2024. - 24 p. : il.

ISBN: 978-989-9236-00-4

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2024.

Título: Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal: relatório 2024

Autores: Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias (Departamento de Doenças Infeciosas)

Editor: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP)

Coleção: Relatórios científicos e técnicos

Coordenação técnica editorial: Elvira Silvestre

Paginação: Rodrigo Jorge

Lisboa, março de 2024

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.





Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, IP

Av. Padre Cruz 1649-016 Lisboa
t: 217 519 200 @: info@insa.min-saude.pt

_titulo:

Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal

_subtítulo:

Relatório 2023

_edição:

INSA, IP

_autores: Departamento de Doenças Infecciosas

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias

_local / data:

Lisboa
março 2024



Índice

Índice de tabelas e figuras	4
Nota introdutória	5
1. Enquadramento	6
2. Vigilância laboratorial da TB 2023: dados do Laboratório Nacional de Referência	8
2.1 Caracterização da amostragem	9
2.2 Resultados laboratoriais	13
3. Genotipagem	15
4. Considerações finais	22
Referências bibliográficas	24

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.	10
Tabela 2	Distribuição do número de utentes por grupo etário, género e região de Saúde no período de 01/01/2020 a 31/12/2023.	12
Tabela 3	Número testes efetuados no LNR-TB por ano.	13
Tabela 4	Descrição da amostragem analisada por WGS à data de publicação do presente relatório.	16

Índice de figuras

Figura 1	Distribuição do número de utentes por género e região de Saúde.	10
Figura 2	Distribuição do número de utentes, por faixa etária e região de Saúde, estudados no LNR-TB no período de 2020-2023.	11
Figura 3	Proporção de casos laboratoriais positivos/negativos por utente, ano e região de Saúde.	14
Figura 4	Filogenia global de todas as estirpes do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sujeitas a sequenciação do genoma total no LNR-TB (N=892).	17
Figura 5	Filogenia global de todas as estirpes associadas a tuberculose multirresistente sujeitas à sequenciação do genoma total no LNR-TB (N=173).	19
Figura 6	Distribuição temporal dos clusters com potencial relação epidemiológica, envolvendo estirpes de 2023, com destaque para os perfis de resistência, região de diagnóstico e género do doente.	21

Nota introdutória

A Vigilância Laboratorial da Tuberculose (TB) em Portugal tem passado por uma trajetória marcada por avanços e retrocessos, sem ter ainda alcançado o estabelecimento de uma rede de vigilância ativa, contínua e representativa do panorama nacional. O impulso inicial para sua criação surgiu com o desenvolvimento do Programa Global da Vigilância da Resistência aos Antibacilares, proposto em 1994 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*)¹.

Em Portugal, este programa teve início em 2020, liderado pelo Núcleo de Tuberculose e Doenças Respiratórias da Direção-Geral da Saúde (DGS) em conjunto com o Laboratório de Tuberculose e Micobactérias do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)² e permitiu a constituição do primeiro sistema de vigilância da TB de base laboratorial, o VigLab-TB³. Este sistema integrava todos os laboratórios nacionais que realizavam testes de sensibilidade aos antibacilares de 1ª linha e tinha como principal objetivo a monitorização dos padrões de resistência das estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) circulantes em Portugal, identificando grupos de alto risco para a transmissão de TB multirresistente (TB-MR)⁴.

Após sua suspensão em 2006, o sistema foi reativado pelo INSA em 2013, com uma nova versão que incluía a genotipagem dos isolados de TB-MR para estabelecer possíveis ligações filogenéticas entre estes casos e identificar estirpes prevalentes em circulação⁵. Após uma reunião conjunta dos laboratórios da rede, em novembro de 2016 (II Simpósio de Tuberculose “Redes de Vigilância e

Vigilância Laboratorial”)⁶ foi publicado um relatório científico divulgado pelo INSA e em nome de toda a rede laboratorial integrante.

Com a disseminação dos métodos de sequenciação genómica de nova geração, o Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias (LNR-TB) implementou metodologias baseadas na sequenciação do genoma total (WGS, *Whole Genome Sequencing*) para efetuar, de forma sistemática e rotineira, a previsão de resistências⁷ e vigilância molecular dos casos de TB-MR⁸ 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.

Finalmente, em 2023, o LNR-TB publicou seu primeiro relatório de vigilância molecular da TB, que inclui dados retrospectivos de 2020-2022, com informações genómicas das estirpes de MTC em circulação em Portugal⁹. Apesar dos avanços, a representatividade nacional ainda não foi alcançada, já que o relatório se baseou apenas nos isolados enviados e analisados no LNR-TB. Acreditamos, no entanto, ser este o caminho para implementar um sistema de vigilância mais robusto e abrangente, incluindo todas as estirpes de MTC isoladas em Portugal, com o objetivo de divulgar periodicamente essas informações de forma inclusiva a todos os profissionais de saúde na área da TB.

①

Enquadramento

A Tuberculose (TB) continua a ser um dos principais problemas de saúde pública mundial e os dados mais recentes divulgados pela OMS estimam que, em 2022, 10.6 milhões de pessoas adoeceram e 1.3 milhões de pessoas morreram¹⁰.

O relatório do ECDC (*European Centre for Disease Control and Prevention*)¹¹, descreve que, em 2022, foram notificados 36.179 casos de TB na região europeia (taxa de notificação 8,0/100.000 habitantes), com maior incidência em indivíduos do sexo masculino entre os 25 e os 44 anos (9,5/100.000 habitantes), e dos quais, 1.214 casos (3,6%; 1,9/100.000 habitantes) foram de TB infantil (idade inferior a 15 anos). 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), e com o número de casos de TB resistentes à rifampicina ou multirresistentes (TB-RR/MR) a continuar a apresentar uma tendência decrescente. De facto, em 2022, foram notificados 933 casos de TB-RR/MR (taxas de notificação variaram entre 0% na Croácia e 25,5% na Estónia), dos quais 251 eram casos de TB extensivamente resistente (TB-XDR) e 135 casos de TB pré-XDR.

Em Portugal, de acordo com o último Relatório da Vigilância e Monitorização da Tuberculose da DGS¹², em 2022, foram notificados 1518 casos de TB, mantendo a tendência decrescente esperada (taxa de notificação 14,5/100.000 habitantes; taxa de incidência 13,4/100.000 habitantes). A região de Lisboa e Vale do Tejo (LVT) e a região Norte continuam a apresentar o maior número de casos de TB, com, respetivamente, taxas de

notificação de 17,8/100.000, e 17,5/100.000 habitantes. Os distritos de Lisboa, Porto e Setúbal apresentaram taxas de notificação superiores a 20 casos por 100.000 habitantes.

Em 2022, 71,3% do total de casos confirmados apresentaram resultado de teste de suscetibilidade aos antibacilares de 1ª linha¹². A resistência à isoniazida em conjunto com outras resistências (qualquer) ou isolada (monoresistência) ocorreu em 5,4% e 3,8% dos casos, respetivamente. Dos 12 casos de TB-RR/MR (um caso monoresistente à rifampicina e 11 casos multirresistentes), apenas 4 (33,3%) eram doentes nascidos em Portugal e a maioria dos casos (oito casos; 66,7%) foram diagnosticados em LVT. Não se identificou nenhum caso de TB-XDR em 2022¹².



Vigilância laboratorial da Tuberculose

dados do Laboratório Nacional de Referência

2. Vigilância laboratorial da Tuberculose: dados do Laboratório Nacional de Referência

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 clínico. De acordo com os dados atuais do relatório da DGS ¹², em 2022 foram confirmados (casos de TB com cultura positiva para MTC ou exame direto e teste de amplificação de ácidos nucleicos positivos) 856 casos de TB (56% do número total de casos), 322 (21%) casos foram classificados como prováveis (caso de TB exame direto positivo ou teste de amplificação de ácidos nucleicos positivo ou exame anatomo-patológico compatível) e 340 (22%) casos como possíveis (caso de TB apenas com critérios clínicos e/ou imagiológicos e sem resultados laboratoriais).

No presente relatório pretendemos descrever os dados microbiológicos, genómicos e demográficos de todos os casos de TB que foram enviados ao LNR-TB do INSA para confirmação laboratorial do diagnóstico desde 2020, com especial enfoque para o ano de 2023.

2.1 Caracterização da amostragem

No ano de 2023 assistimos a um aumento de 13%, relativamente a 2022, no número de requisições que deram entrada no LNR-TB, o que se traduziu num aumento de 13% no número de amostras biológicas e 11% no número de utentes. Durante o período de 01/01/2020 a 31/12/2023, foram enviadas ao LNR-TB do INSA 13683 requisições clínicas correspondentes a 9431 utentes e 21137 amostras biológicas ([Tabela 1](#)).

As características demográficas e origem geográfica das amostras estão representadas na [Tabela 2](#) e [Figuras 1](#) e [2](#). A maioria das amostras são provenientes da região de Lisboa e Vale do Tejo (LVT) e da região Norte, dado serem estas as regiões de maior abrangência do LNR-TB. Verificámos, também, um aumento de 30% no número de requisições provenientes da Região Autónoma dos Açores (Açores-RA), no ano de 2023 relativamente a 2022. Mantendo a tendência dos anos anteriores, também em 2023, 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 45 e os 75 anos.

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

Ano	N de requisições	N de amostras	N de utentes
2020	3039	4539	2184
2021	3300	5148	2158
2022	3423	5343	2401
2023	3921	6107	2688
Total	13683	21137	9431

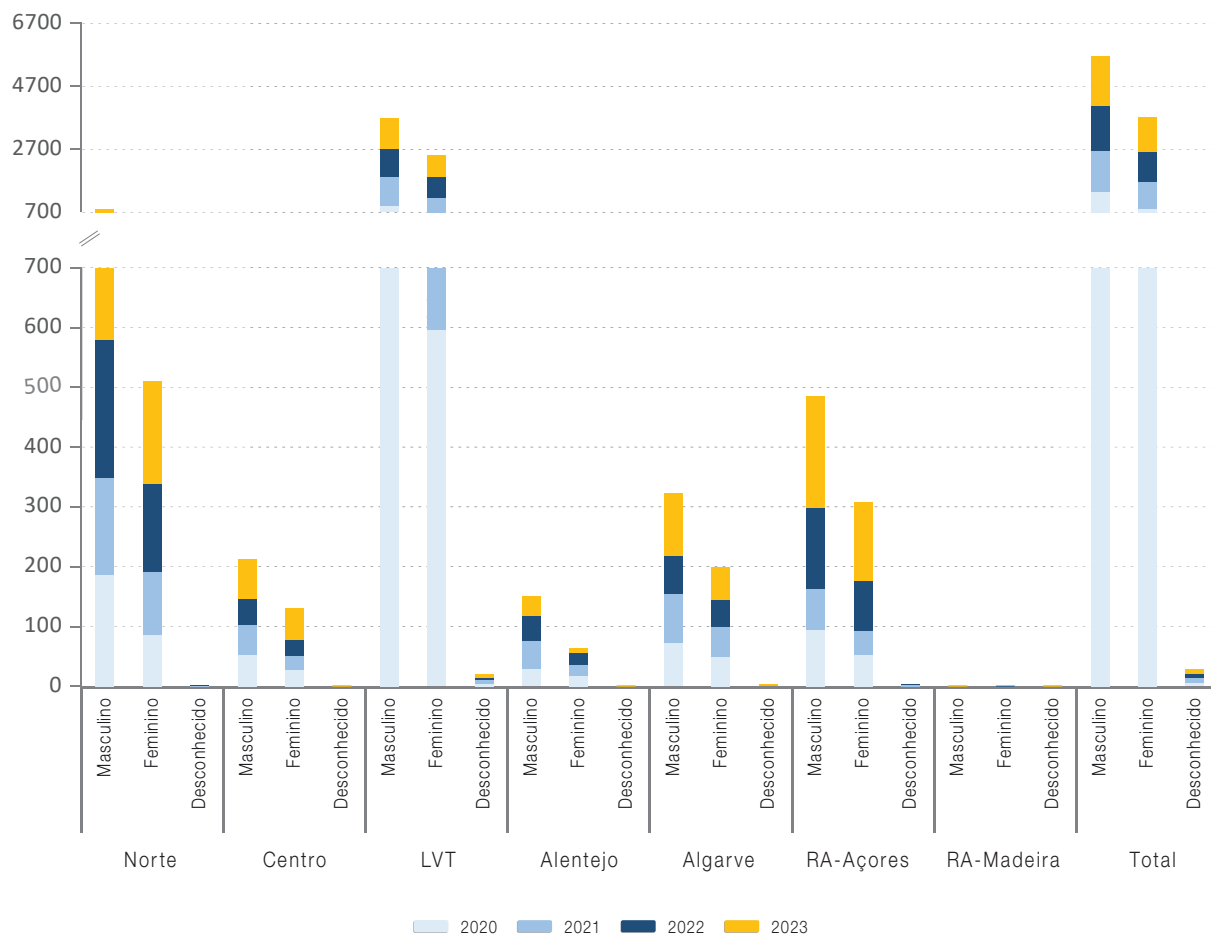


Figura 1 – Distribuição do número de utentes por género e região de Saúde.

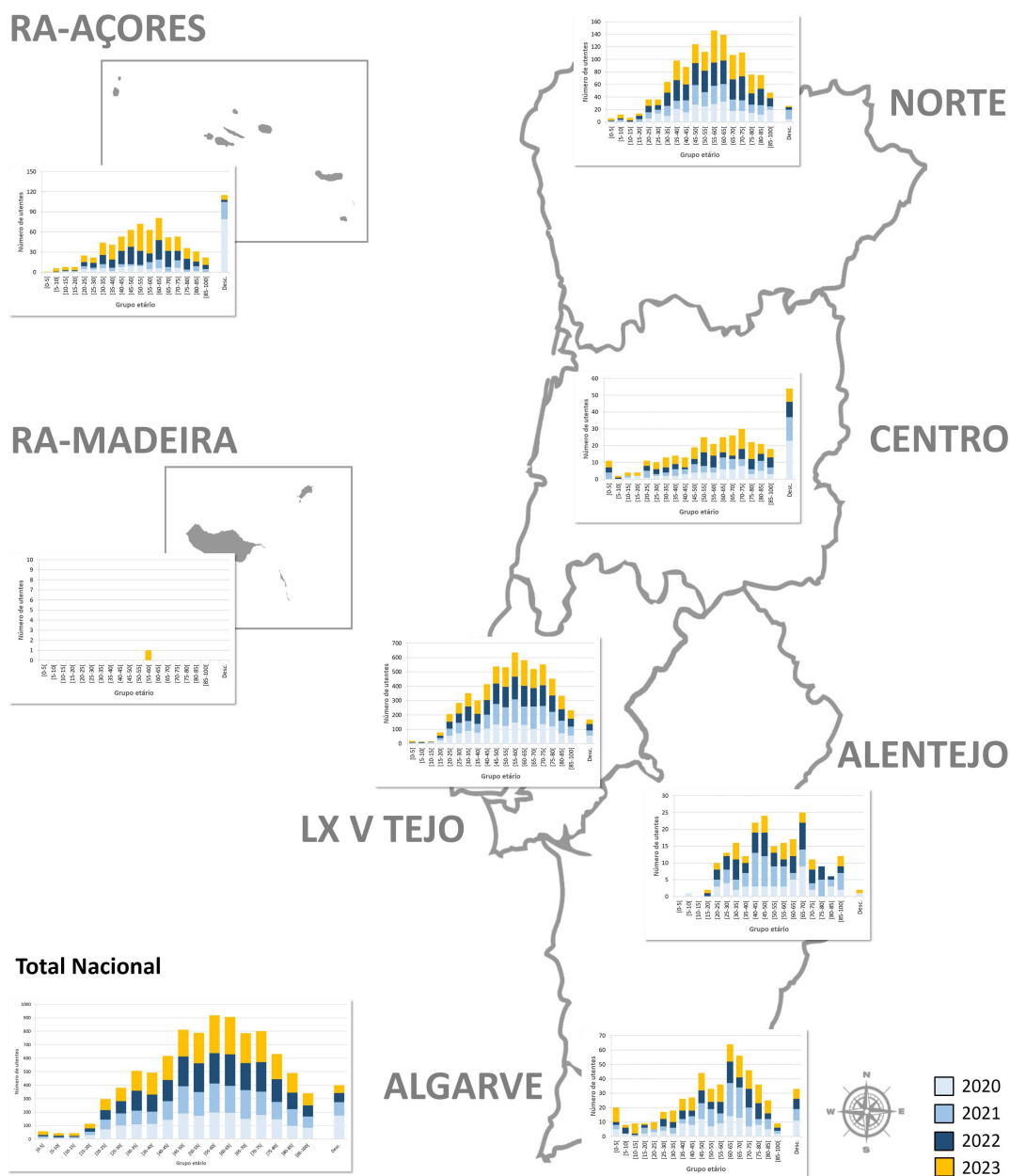


Figura 2 – Distribuição do número de utentes, por faixa etária e região de Saúde, estudados no LNR-TB no período de 2020-2023. Desc. – Desconhecido.

Tabela 2 – Distribuição do número de utentes por grupo etário, género e região de Saúde no período de 01/01/2020 a 31/12/2023.

Ano	Sexo	Região de Saúde							Total
		LVT	Norte	Centro	Alentejo	Algarve	RA-Açores	RA-Madeira	
[0-5[♂	12	3	8	0	12	1	0	36
	♀	8	3	3	0	8	0	0	22
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[5-10[♂	4	7	0	1	4	4	0	20
	♀	10	5	2	0	4	2	0	23
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[10-15[♂	8	2	3	0	4	5	0	22
	♀	8	4	1	0	5	3	0	21
	Desc.	0	1	0	0	0	0	0	1
[15-20[♂	39	9	3	1	6	5	0	63
	♀	39	5	1	1	3	3	0	52
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[20-25[♂	116	25	7	6	6	15	0	175
	♀	88	11	4	4	4	10	0	121
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[25-30[♂	173	19	7	10	10	11	0	230
	♀	105	17	3	3	7	11	0	146
	Desc.	5	0	0	0	0	0	0	5
[30-35[♂	208	42	7	14	13	20	0	304
	♀	141	22	6	2	5	23	0	199
	Desc.	2	0	0	0	0	1	0	3
[35-40[♂	164	58	10	7	15	31	0	285
	♀	138	40	4	5	11	10	0	208
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[40-45[♂	231	51	8	17	15	35	0	357
	♀	182	37	5	5	12	18	0	259
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[45-50[♂	337	75	13	17	29	38	0	509
	♀	200	49	6	7	15	25	0	302
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[50-55[♂	326	74	16	11	22	53	0	502
	♀	205	38	9	4	11	19	0	286
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[55-60[♂	370	90	13	10	20	38	0	541
	♀	263	56	8	6	16	25	1	375
	Desc.	2	0	0	0	0	0	0	2
[60-65[♂	343	89	14	10	45	51	0	552
	♀	238	50	11	7	19	30	0	355
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[65-70[♂	311	69	17	17	35	36	0	485
	♀	209	38	9	8	21	16	0	301
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[70-75[♂	329	73	15	8	25	30	0	480
	♀	222	38	15	3	21	23	0	322
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[75-80[♂	283	41	14	5	21	18	0	382
	♀	170	35	8	4	15	18	0	250
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
[80-85[♂	188	39	12	5	20	17	0	281
	♀	144	36	9	1	5	14	0	209
	Desc.	1	0	0	0	0	0	0	1
[85-100]	♂	133	27	9	9	7	10	0	195
	♀	100	20	9	3	2	12	0	146
	Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0
Desc.	♂	109	19	37	2	14	68	0	249
	♀	53	7	17	0	15	45	0	137
	Desc.	7	0	0	0	4	2	0	13
Total de utentes por região		6228	1324	343	213	526	796	1	

♂ – Masculino; ♀ – 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 17.467 pesquisas de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), 26.831 isolamentos em cultura (em meios sólido e/ou líquidos), 7.866 pesquisas moleculares (identificação de MTC e/ou resistências diretamente na amostra biológica), 2.212 identificações de culturas, e 1.316 testes de suscetibilidade a antibióticos (TSA). Particularizando para o ano de 2023, verificou-se um aumento de 10% nos pedidos dos variados parâmetros laboratoriais de diagnóstico de TB comparativamente a 2022. Globalmente, obteve-se uma taxa de positividade por utente de ~20%

ao ano, independentemente da análise realizada (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 tem-se mantido relativamente constante durante os anos em análise, e, em 2023, 8,5% das pesquisas de BAAR retornaram resultados positivos, 16,6% dos PCR foram positivos para MTC, e em 12,1% de culturas em meio líquido e 9,5% de culturas em meio sólido foi isolado MTC (Figura 3 e Tabela 3).

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

Ano	Pesquisa de BAAR	PCR	Cultura em meio líquido	Cultura em meio sólido	ID complexo <i>M. tuberculosis</i>	TSA	Total de positivos / total de utentes
	(#pos/#testes)					(#testes)	
2020	394/3647	298/1647	225/1948	264/3374	364/564	362	520/2184
	(10,80%)	(18,09%)	(11,55%)	(7,82%)	(64,54%)		(23,81%)
2021	427/4239	356/2183	343/2847	400/3836	328/513	323	519/2158
	(10,07%)	(16,31%)	(12,05%)	(10,43%)	(63,94%)		(24,05%)
2022	452/4520	318/1949	324/2812	455/4199	329/511	325	450/2401
	(10,00%)	(16,32%)	(11,52%)	(10,84%)	(64,38%)		(18,74%)
2023	429/5061	346/2087	370/3071	451/4744	324/627	306	525/2688
	(8,48%)	(16,58%)	(12,05%)	(9,51%)	(51,67%)		(19,53%)

Os valores entre parenteses 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 antibióticos.

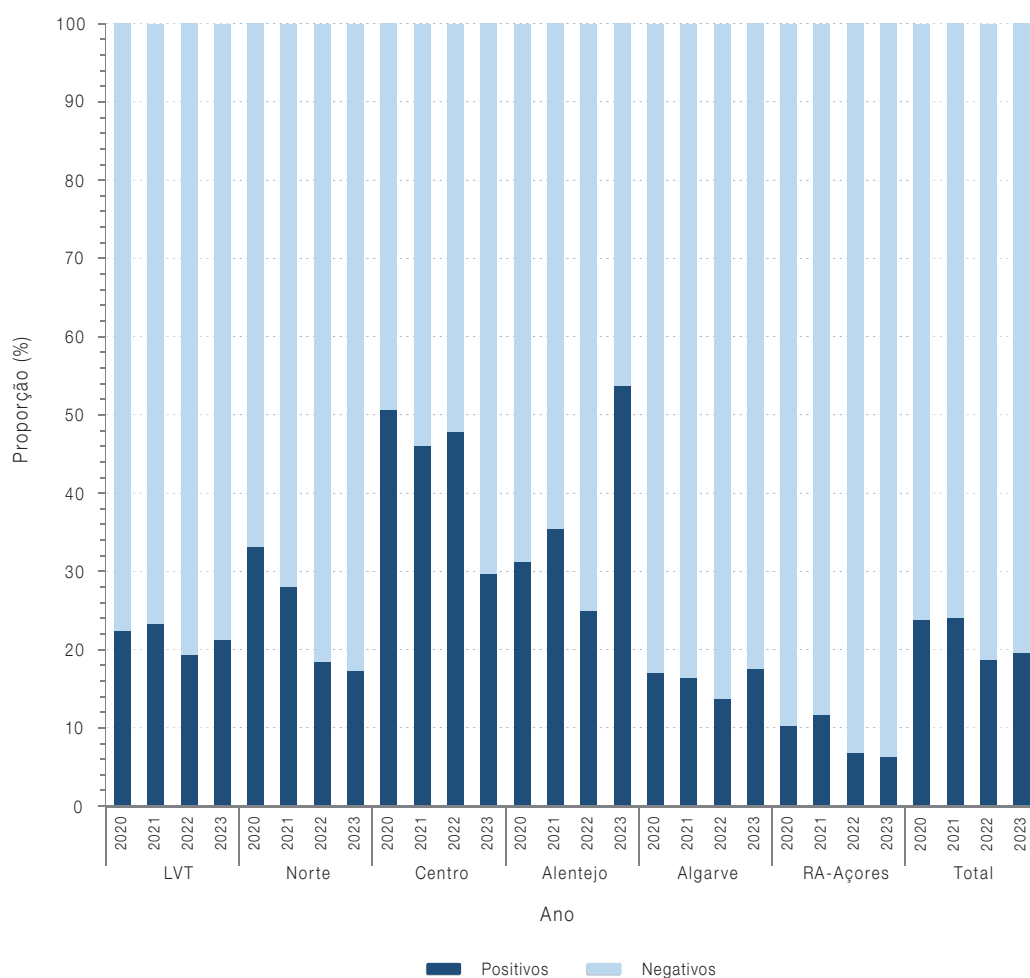


Figura 3 – Proporção de casos laboratoriais positivos/negativos por utente, ano e região de Saúde. Um caso foi considerado positivo se teve, pelo menos, um resultado laboratorial positivo (BAAR, identificação de MTC ou PCR) e contabilizado apenas uma vez por utente. A região da Madeira não se encontra representada no gráfico por apresentar apenas 4 pedidos de análise para identificação de micobactérias não tuberculosas.

③

Genotipagem

Tendo em vista a implementação de um sistema de vigilância molecular ativo, robusto e cada vez com maior representatividade nacional, efetuámos estudos de sequenciação genómica de isolados de MTC. Na **Tabela 4** apresenta-se uma descrição das características demográficas dos doentes e resultados microbiológicos das estirpes analisadas (n=892). Inclui todas as estirpes

de TB-MR de 2013 a 2023, estirpes analisadas em contextos de projetos de investigação, estirpes enviadas para investigação de potenciais surtos ou casos de transmissão e todas as estirpes com isolamento de MTC entre 2020 a 2023 enviadas ao LNR-TB para o diagnóstico de confirmação do caso de TB.

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	2023	
Género													
♂	3	9	74	22	22	21	26	39	14	114	123	154	621
♀	1	4	35	3	7	10	15	11	10	46	60	64	266
Desc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	5
Grupo etário													
[0-5[0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	4
[5-10[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
[10-15[0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	4
[15-20[0	1	1	0	1	0	1	3	0	1	2	5	15
[20-25[0	2	6	1	4	1	2	1	2	9	7	9	44
[25-30[1	1	4	2	1	1	1	3	1	18	11	22	66
[30-35[0	2	6	1	0	3	2	4	1	11	16	15	61
[35-40[0	1	12	3	2	2	3	3	1	11	8	17	63
[40-45[0	3	20	5	7	1	6	5	6	10	16	20	99
[45-50[1	1	19	0	3	1	1	6	2	20	27	27	108
[50-55[0	2	12	4	5	4	2	4	2	19	18	18	90
[55-60[0	0	7	4	1	6	5	3	5	12	19	15	77
[60-65[1	0	5	2	3	2	4	0	0	10	19	20	66
[65-70[0	0	7	0	1	0	2	2	0	6	11	14	43
[70-75[0	0	0	0	1	1	2	1	2	8	10	11	36
[75-80[0	0	3	1	0	0	0	3	0	7	4	6	24
[80-85[0	0	4	0	0	0	2	1	0	5	5	5	22
[85-100]	0	0	1	0	0	2	2	1	0	6	5	5	22
Desc.	1	0	2	2	0	5	3	9	2	10	5	8	47
Região de residência													
Alentejo	0	1	0	0	0	0	4	5	1	23	30	40	104
Algarve	0	0	0	1	0	0	0	1	3	2	2	7	16
AML	0	8	97	13	14	12	14	17	14	111	133	145	578
Centro	0	0	3	1	4	0	0	4	0	5	4	11	32
Norte	4	4	9	9	11	18	23	22	6	13	8	8	135
RA-Madeira	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	5
RA-Açores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	6	8	22
Perfil de resistência													
MDR-TB	0	8	18	16	14	8	8	6	11	8	7	13	117
Pré-XDR-TB	0	5	4	3	3	3	12	1	5	5	1	3	45
RR-TB	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	2	4	11
HR-TB	0	0	8	0	1	6	0	4	5	10	18	15	67
Outros	0	0	10	0	1	0	1	2	0	13	16	13	56
Sensível	4	0	69	6	10	14	20	33	3	126	139	172	596

♂ – Masculino; ♀ – 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.

Na **Figura 4** apresenta-se a filogenia global desta amostragem. A análise filogenética revelou a existência de 130 *clusters* moleculares em circulação desde 2013, constituídos por duas a 31 estirpes de MTC, sendo que um *cluster* molecular foi definido como duas ou mais estirpes que partilham a mesma informação genética (para efeitos da construção da figura, as estirpes foram agregadas a 24 posições variáveis - SNP, single nucleotide polymorphisms). A figura demonstra a relação molecular entre as estirpes analisadas identificando a sua proximidade por linhagem (**Figura 4A**), ano de diagnóstico (**Figura 4B**), região de saúde (**Figura 4C**) e perfil de suscetibilidade/resistên-

cia (**Figura 4D**). Na sua maioria, as estirpes são provenientes de doentes do género masculino (69,6%), nas faixas etárias dos 40 aos 65 anos (49,3%) e residentes na Área Metropolitana de Lisboa (64,8%). Relativamente aos perfis de resistência/suscetibilidade aos antibacilares, 19,8% das estirpes analisadas são multirresistentes ou resistentes à rifampicina, 7,5% das estirpes apresentam resistência à isoniazida (resistência isolada ou em combinação com outros antibacilares exceto a rifampicina) e 33,2% das estirpes apresentam pelo menos uma resistência a qualquer antibacilar.

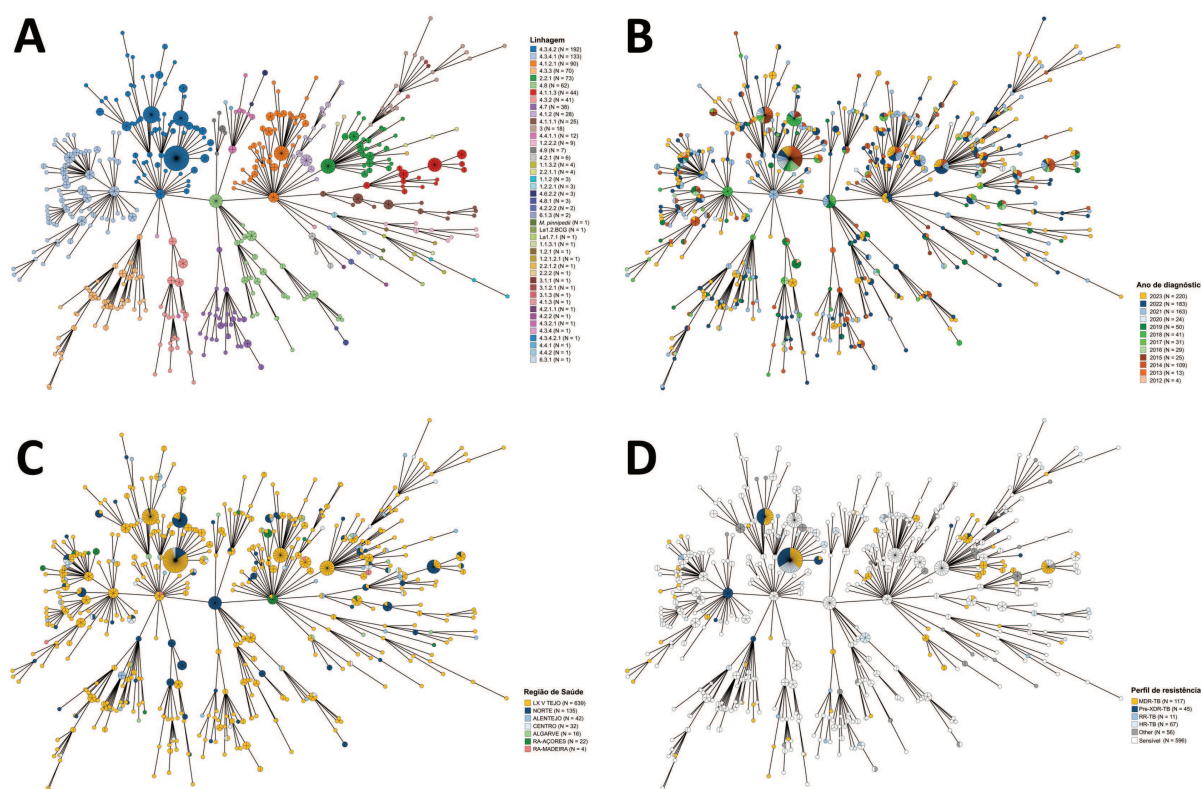


Figura 4 – Filogenia global de todas as estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* sujeitas a sequenciação do genoma total no LNR-TB (N=892). A árvore filogenética (MST, minimum spanning tree) foi gerada a partir dos sítios variáveis (SNPs, single nucleotide polymorphisms) partilhados por todas 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 distância até 24 SNPs foram colapsadas, 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.

Para fazer uma análise mais rigorosa dos casos de TB RR/MR em circulação em Portugal, efetuámos a mesma abordagem de construção de árvores filogenéticas, e todas as estirpes com menos de 12 SNP foram colapsadas num mesmo nó da árvore, isto é, agregadas como sendo a mesma estirpe, de forma a destacar clusters genéticos com possíveis relações epidemiológicas. Na [Figura 5](#) destacam-se as relações filogenéticas entre todas estirpes associadas a casos de TB-RR/MR (n=173). À semelhança da análise da filogenia global de todas as estirpes, apresentamos as relações moleculares encontradas evidenciando a categorização de perfil de resistência ([Figura 5A](#)), o perfil completo de resistência aos antibacilares de 1ª e de 2ª linha ([Figura 5B](#)), o ano de diagnóstico ([Figura 5C](#)) e a região de residência do doente ([Figura 5D](#)). Maioritariamente, as estirpes pertencem à linhagem 4 (79,8%), em particular às sub-linhagens 4.3.4.2. (35,2%) e 4.3.4.1 (15,0%), seguido da linhagem 2 (17,3%) ([Figura 4A e 4D](#)). De acordo com a nova definição da OMS¹³, desde 2013 que não é diagnosticado nenhum caso de TB-XDR 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 aos injectáveis de 2ª linha em simultâneo (26,6%), que classificariam os casos como XDR de acordo com a definição antiga e que são agora consideradas pré-XDR. Embora entre 2013 e 2022 se tenha assistido a uma tendência decrescente no número de casos de TB-MR, com uma redução média de 2%/ano, em 2023 foram diagnosticados 20 novos casos de TB-RR/MR, correspondendo a um aumento

de 50% relativamente a 2022. Estes casos de TB-RR/MR de 2023 encontram-se distribuídos em três regiões de Portugal, com nove casos isolados na região de LVT, quatro casos na região Norte e seis casos no Algarve ([Figura 5C e 5D](#)). Não tendo acesso à maioria dos dados clínicos e epidemiológicos dos doentes é difícil inferir causas que possam justificar este aumento, no entanto, mais de metade dos casos são em doentes de nacionalidade estrangeira, maioritariamente oriundos de Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP) (dados não apresentados).

No global, a maioria dos casos de TB-RR/MR (63,6%) continua a ocorrer na região de LVT, seguido da região Norte (20,8%), e com uma tendência crescente na região do Algarve que importa vigiar ([Figura 5D](#)). Destaca-se a existência de três grandes clusters moleculares (constituídos por sete a 27 estirpes) que incluem doentes com características demográficas variadas e estirpes com diferentes perfis de resistência, sendo, no entanto, constituídos pela quase totalidade dos casos de TB pré-XDR ([Figura 5A](#)). 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 confirmar de que se tratam efetivamente de estirpes de MTC multirresistentes persistentes.

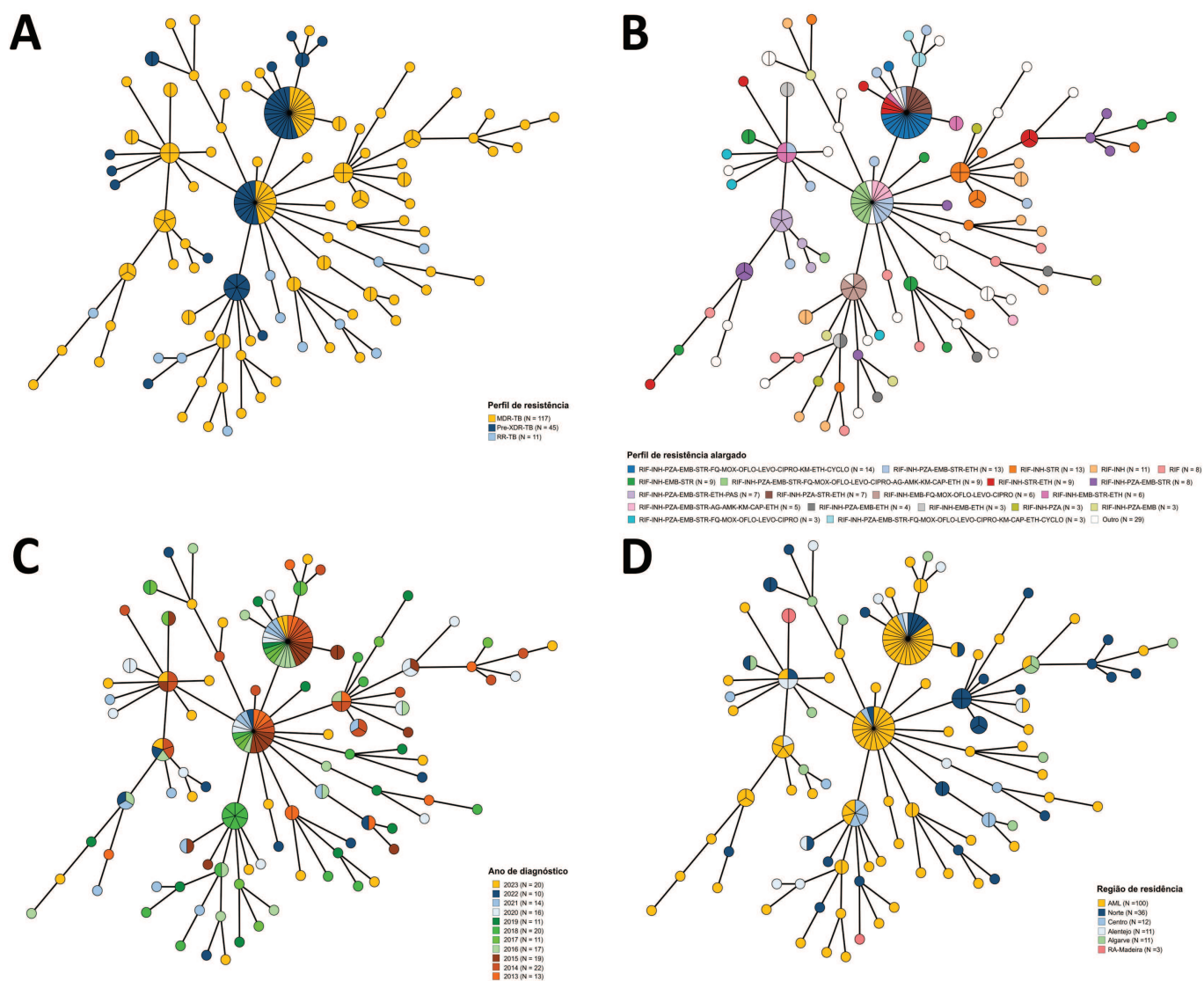


Figura 5 – Filogenia global de todas as estirpes associadas a tuberculose multirresistente sujeitas à sequenciação do genoma total no LNR-TB (N=173). A árvore filogenética (MST, minimum spanning tree) foi gerada a partir dos sítios variáveis (SNPs, single nucleotide polymorphisms) partilhados por todas as estirpes em relação ao genoma de referência de *M. tuberculosis* H37Rv (N=9845 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 rifamicina; STR – estreptomicina; INH – isoniazida; RIF – rifamicina; 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 desde 2020, num contexto de confirmação diagnóstica inicial do caso de TB, enquadrando-as nas análises moleculares das estirpes que já se encontravam em vigilância desde 2013 (isto é, casos de TB-RR/MR ou suspeitas de surtos). Foram identificados 51 *clusters* moleculares com casos de 2023 e cujas principais características se encontram descritas na [Figura 6](#). Embora alguns destes *clusters*, com menor número de casos (*clusters* 1, 2, 3, 4, 8, 12, 15, 17, 19, 21, 25, 26, 27, 28, 30, 33, 38, 44 e 45), sejam muito recentes (2022 ou 2023), existem *clusters* que remontam a 2013 (como é o caso de *cluster* 47) 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 um dia – *cluster* 15 – e 3733 dias – *cluster* 47, [Figura 6](#)) que seria importante esclarecer.

Verificamos que todos os casos de TB-MR e TB pré-XDR estão agrupados em três *clusters*. O *cluster* 32 é composto por estirpes de MTC multirresistentes, em circulação desde 2014, isoladas de cinco doentes (três do sexo masculino) na sua maioria residentes na região de LVT. O *cluster* 41, também composto por estirpes multirresistentes em circulação desde 2014, inclui quatro doentes de três regiões (um doente residente em LVT, 2 doentes da região Centro e um doente da região Norte). O *cluster* 47 inclui estirpes de TB pré-XDR isoladas desde 2013 (n=15),

estirpes de TB-MR (n=13) e três estirpes mono-resistentes à isoniazida. É composto maioritariamente por doentes do sexo masculino (77,0%) residentes na região de LVT (80,6%) e é o único que inclui estirpes pré-XDR. Existem ainda dois pequenos *clusters*, cada um com duas estirpes, de casos de TB-RR, *cluster* 30 e *cluster* 44, de doentes do sexo masculino residentes na região de LVT e região Norte, respetivamente. Importa chamar a atenção para os *clusters* 14 e 49, dois dos maiores *clusters* moleculares identificados, com 18 e 12 casos, respetivamente, em circulação desde 2014 e compostos por estirpes de MTC suscetíveis apenas de doentes residentes na região de LVT.

Para esclarecer em absoluto a existência de cadeias de transmissão ativas é fundamental confrontar estes dados moleculares com informação epidemiológica dos doentes, caso contrário, apenas podemos realçar a persistência de determinadas linhagens de estirpes em circulação.

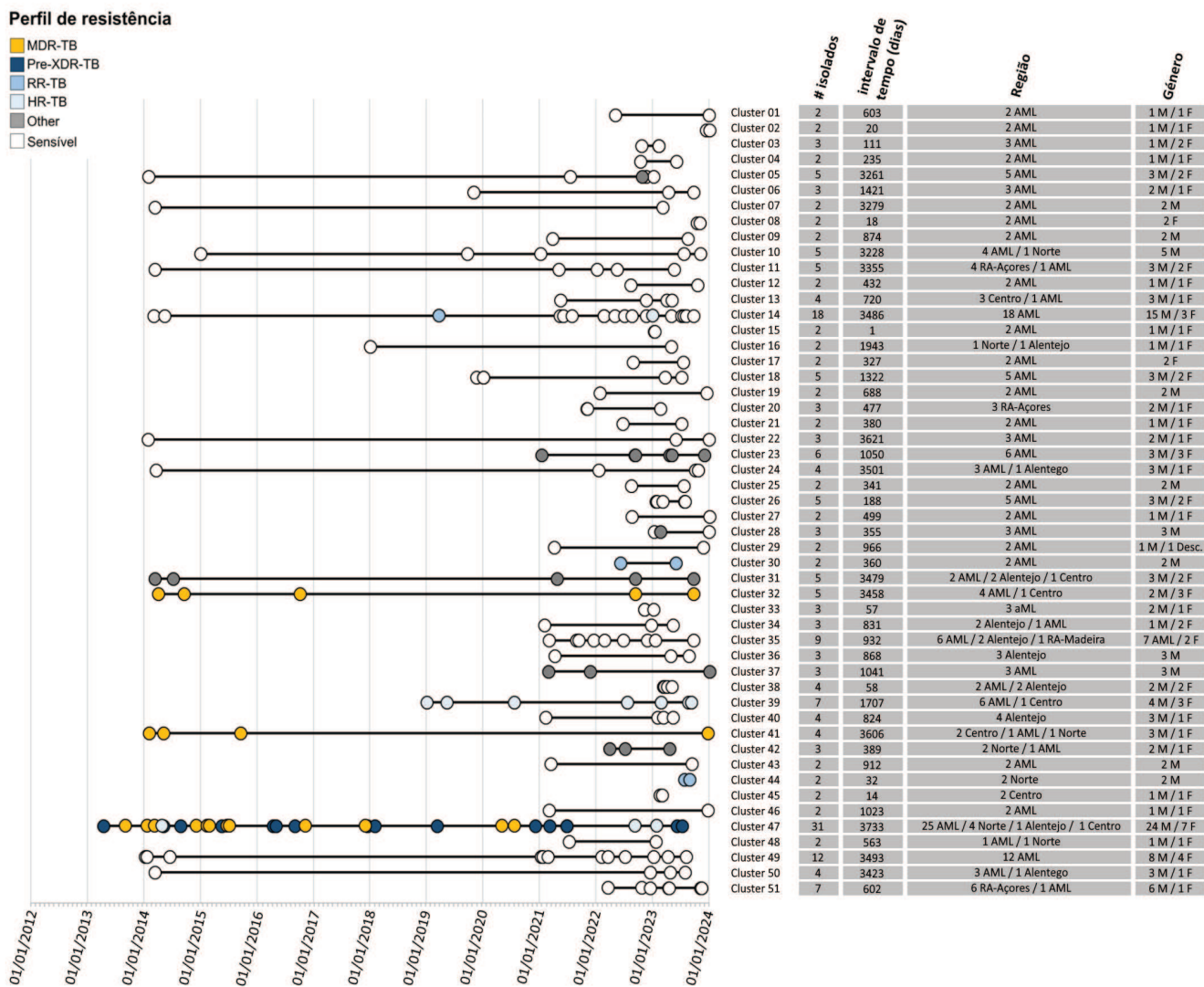


Figura 6 – Distribuição temporal dos clusters com potencial relação epidemiológica, envolvendo estirpes de 2023, com destaque para os perfis de resistência, região de diagnóstico e género do doente. M – Masculino; F – Feminino; AML – Área metropolitana de Lisboa; RA-Açores – Região Autónoma dos Açores; RA-Madeira – Região Autónoma da Madeira; 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 continua a ter o objetivo de realizar esta abordagem a todas as amostras de todos os casos de TB enviadas para diagnóstico com uma representatividade nacional.

Para permitir que este objetivo seja cumprido de forma efetiva, é fundamental não só otimizar a rede de laboratórios de TB, através da formalização 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 antibióticos, 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/T-B/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 Antibacterianos-VigLab-Tuberculose). 2003. Vigilância Laboratorial da Resistência aos Antibacterianos 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.in-sa.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 – Vigilância Laboratorial da Tuberculose - Relatório 2020-2022. Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias (2023). <http://hdl.handle.net/10400.18/8608>
- 10 – World Tuberculosis Day 2024. World Health Organization. <https://www.who.int/campaigns/world-tb-day/2024>
- 11 – European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis situation in the EU/EEA, 2022: Findings from the joint report Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe by ECDC and WHO Regional Office for Europe. Stockholm, 21 March 2024.
- 12 – Direcção-Geral da Saúde. Relatório da Vigilância e Monitorização da Tuberculose em Portugal: dados definitivos de 2022. Programa Nacional para a Tuberculose, março 2024.
- 13 – 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 Infeciosas

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) 223 401 100
E-mail: inforporto@insa.min-saude.pt

Centro de Estudos de Vetores de Doenças Infeciosas
Doutor Francisco Cambournac
Av. da Liberdade, n.5, 2965-575 Águas de Moura, Portugal
Tel.: (+351) 265 938 295
E-mail: cevdi@insa.min-saude.pt