

Breve história da micobacteriologia no IHMT/UNL

Brief history of mycobacteriology at IHMT/UNL

Miguel Viveiros

Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa (IHMT, UNL), Lisboa, Portugal
mviveiros@ihmt.unl.pt

Isabel Couto

Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa (IHMT, UNL), Lisboa, Portugal

Resumo

Este artigo revê o estudo da tuberculose e de outras micobacterioses no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, ao longo dos mais de cem anos de história deste instituto. Se nas primeiras décadas este trabalho se focou sobretudo ao nível do apoio às populações e aos programas locais de luta contra a tuberculose em todos os países e províncias onde o instituto operava numa abrangência global, a criação formal de um grupo de Micobacteriologia em 1999, apoiado pela instalação de um Laboratório de Biosegurança P3 para Micobacteriologia, veio transformar o trabalho desenvolvido no instituto ao nível da tuberculose e outras micobacterioses. Em simultâneo, estabeleceram-se parcerias com os hospitais da área da Grande Lisboa, procurando levar até eles os benefícios da investigação implementacional de novas técnicas e metodologias para a deteção precoce e precisa da tuberculose e outras micobacterioses.

Do trabalho desenvolvido ao longo destes últimos 15 anos destacam-se a implementação e avaliação de novas tecnologias de biologia molecular pelo impacto que tiveram no combate à tuberculose em Portugal e nos países da CPLP, a criação do Grupo de Trabalho para a Tuberculose na Grande Lisboa, envolvendo doze hospitais desta área, a implementação em Portugal de sistemas automatizados de cultura rápida, de métodos moleculares para identificação de micobactérias e rastreio de mutações que conferem resistência aos tuberculostáticos, bem como o estabelecimento de redes de trabalho e formação ao nível clínico-laboratorial, em Portugal e na CPLP – A Rede FORDILAB-TB – projetos e iniciativas e que mereceram desde a primeira hora o apoio da Fundação Calouste Gulbenkian. Merecem igual destaque, pelo impacto que poderão vir a ter no futuro, a investigação aplicada no desenho e teste de novas abordagens de deteção precoce e tratamento da tuberculose, incluindo o desenvolvimento de testes *in vitro* para avaliação da efectividade de esquemas de tratamento personalizado para cada doente de Tuberculose e Tuberculose resistente.

Palavras Chave:

Tuberculose, outras micobacterioses, multirresistência, diagnóstico laboratorial atempado e de qualidade, novas tecnologias de diagnóstico e tratamento.

Abstract

This article reviews the studies on tuberculosis and other mycobacterial diseases at the Institute of Hygiene and Tropical Medicine, over more than one hundred years of history of this institute. If in the first decades these studies were focused on the public care and support to the local health programs to control tuberculosis in all the countries and provinces where the institute was operating globally, the formal establishment of a Mycobacteriology group in 1999, leveraged by the installation of a Biosafety Level 3 Mycobacteriology Laboratory, boosted this area of research at the institute. Concurrently, partnerships with hospitals in the Lisbon area, brought to them the benefits of the implementation research of new techniques and methodologies for the early and accurate detection of tuberculosis and other mycobacteriosis.

From the work developed over the past 15 years its stands out the implementation and evaluation of new molecular biology based technologies due to the impact made on the diagnosis of tuberculosis in Portugal and in the CPLP countries the establishment of the Working Group on Tuberculosis in the Greater Lisbon Area, involving twelve hospitals in this area; the implementation and evaluation in Portugal of rapid and automated culture systems as well as new molecular methods for the early identification of mycobacteria and screening of mutations that confer drug resistance and ultimately the establishment of a Tuberculosis Laboratories Network at the level of Portugal and the CPLP countries – the FORDILAB-TB - an initiative that deserved, from the on set, the support and encouragement of the Calouste Gulbenkian Foundation. Of equal prominence, in view of the impact in the future, is the applied research on the design and testing of new approaches for the early detection and treatment of tuberculosis, including the development and *in vitro* testing of personalized treatment regimens for tuberculosis and drug-resistant tuberculosis patients.

Key Words:

Tuberculosis, other mycobacterial diseases, multiresistance, early and quality assured laboratory diagnosis, new technologies for diagnosis and treatment.

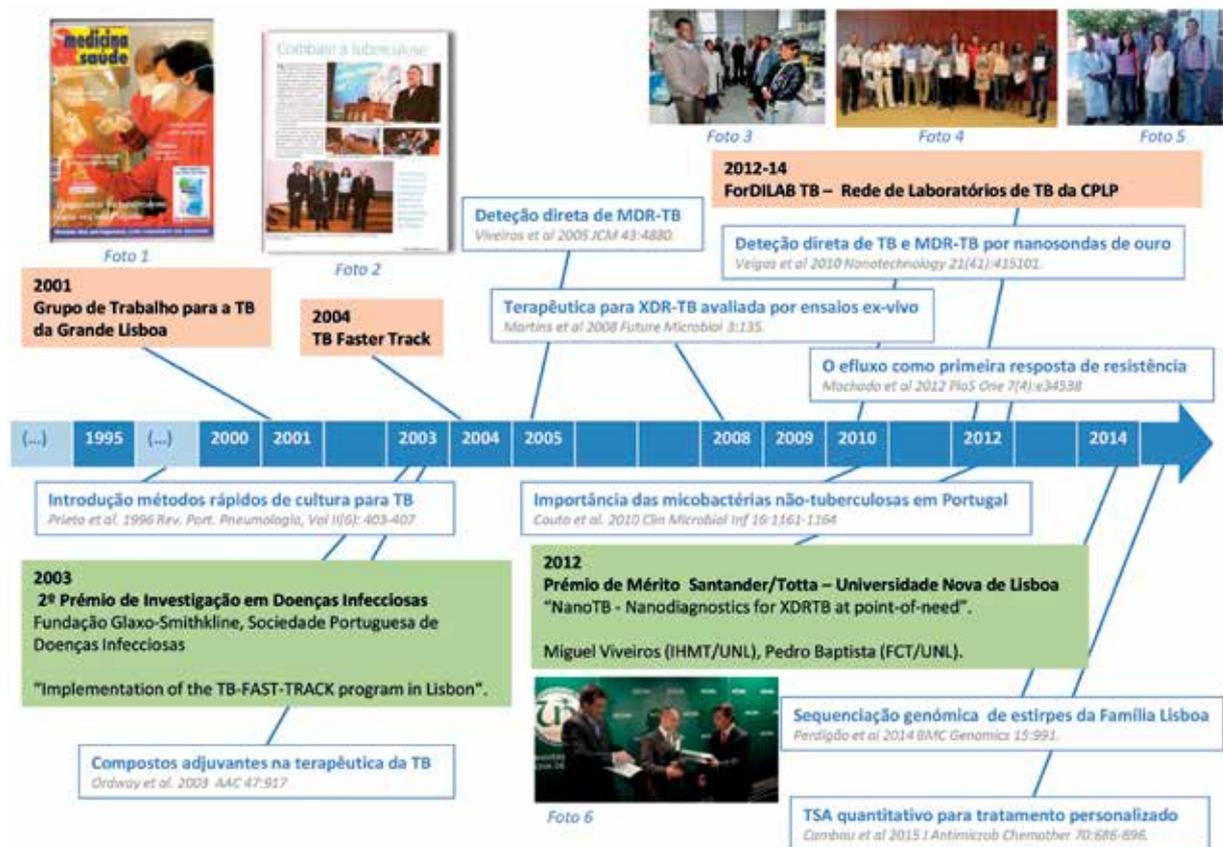


Fig. 1 – Cronograma dos momentos e contribuições científicas mais relevantes da breve história da micobacteriologia no IHMT/UNL

Embora o Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL) possua um vastíssima história no combate às doenças infecciosas, a micobacteriologia e em particular a tuberculose, não foram durante muito tempo objeto desse combate, dado que a tuberculose e a lepra estavam tradicionalmente adstritos aos serviços nacionais de saúde pública e aos programas nacionais específicos de combate a estas enfermidades. A severidade e importância para a saúde pública em Portugal continental e nos territórios além-mar, onde o IHMT prestava serviço assistencial, destas duas doenças, assim o exigiam [1,2]. Contudo, de entre as enfermidades de origem micobacteriana mais estudadas na história do IHMT, a lepra foi a que mais atenção recebeu, pois grassava em todos estes territórios, em particular nas tribos indígenas da Guiné e da Angola, ressaltando-se as missões do Dr. Augusto Salazar Leite na Guiné e em Angola nos anos 50 do século XX [3,4]. No respeitante à tuberculose, as missões do IHMT centraram-se no apoio aos programas locais de luta contra a tuberculose, como relatam as missões de Fraga de Azevedo e de Pedroso Ferreira a Timor e Macau, respetivamente [5,6]. Sendo as micobacterioses uma das muitas patologias de origem bacteriana que o Departamento de Microbiologia Médica do IHMT/UNL estudava durante a primeira metade do século XX, não lhe foi contudo dada a mesma relevância que foi dada a outras enfermidades como a malária, a filaríase ou a tripanossomíase [7]. O IHMT/UNL ocupava assim o seu lugar na

luta contra as enfermidades consideradas exóticas para o contexto médico de Portugal continental, focando-se na assistência às populações dos territórios do ultramar, não se sobrepondo aos programas nacionais e locais de luta contra a tuberculose e lepra, apenas complementando e alertando sempre que necessário. Porém, na segunda metade do sec. XX, vários fatores sócio-económicos motivaram a deterioração das infraestruturas administrativas, sociais e das políticas de saúde pública que continham a propagação da tuberculose a nível mundial, o mesmo ocorrendo em Portugal. Um excesso de confiança na antibioterapia na cura das infeções micobacterianas, sobretudo nos anos 60 e 70, o aumento da toxicodpendência, a mudança do perfil populacional em resultado da intensa imigração de indivíduos de países com elevada prevalência de tuberculose e a sua concentração nos principais centros urbanos, a pobreza e a desnutrição associada à guerra em países da CPLP em desenvolvimento pós-independência e a ineficiente capacidade de organização da resposta por parte dos sistemas de saúde, foram fatores determinantes no ressurgir da tuberculose nas décadas de 80-90 do século XX a nível global e em particular na CPLP. Em paralelo, a pandemia do Vírus da Imunodeficiência Adquirida/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (VIH/SIDA) levou ao aumento da prevalência de tuberculose a nível mundial e em Portugal, bem como nos países da África sub-sahariana, onde o IHMT/UNL desenvolvia trabalho de investigação aplicado. Tal alteração do panorama das doenças infecciosas a nível

nacional e global motivou a necessidade de dotar a instituição com um laboratório apetrechado e técnicos capacitados para o diagnóstico laboratorial de micobacterioses, capazes de providenciar um diagnóstico rápido, atempado e de qualidade destas infeções, muitas vezes oportunistas, nos doentes co-infetados com VIH [2,7].

O processo de criação do Laboratório de Micobactérias do IHMT/UNL foi iniciado em 1992 sob a Direção da Prof^a Doutora Wanda Canas-Ferreira, com o apoio técnico e científico da Dr^a Emília Prieto e do Dr. João Paulo Carvalho de Sousa, como complemento das diferentes valências de microbiologia que existiam no Departamento de Microbiologia do IHMT e da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, à data uma estrutura comum de ensino da Microbiologia Médica. Nesta altura, o diagnóstico laboratorial diferenciado em micobacteriologia e tuberculose era escasso em Portugal, fruto do desinvestimento nos programas de luta contra a tuberculose após 1974, estando centralizado no Laboratório de Referência Nacional, o Instituto Ricardo Jorge do Porto [2]. Em Lisboa as necessidades eram inúmeras, sentindo-se a carência urgente de modernizar e melhorar o diagnóstico laboratorial das micobacterioses e tuberculose, em particular no respeitante às micobacterioses do doente VIH e ao aumento preocupante dos casos de tuberculose resistente aos tuberculostáticos [2,8]. Em 1995, para acolher o retorno a Portugal do Professor Hugo Lopes Ayres David, antigo diretor do laboratório de Micobacteriologia do CDC de Atlanta (EUA) e do Instituto Pasteur de Paris (França), o Laboratório de Micobactérias do IHMT/UNL reequipou-se com o apoio da Fundação Calouste Gulbenkian através do projeto denominado “Estudo da relação tuberculose-SIDA e dos problemas de transmissão da tuberculose nas populações de alto risco, com a introdução, desenvolvimento e aplicação prática de novos métodos de diagnóstico rápido da tuberculose” (Projeto N^o 9-1.10.6./94, financiado pela Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA e cofinanciado pela Fundação Calouste Gulbenkian, 1995 a 1998). Embora vocacionado para a investigação fundamental em micobacteriologia, o Laboratório de Micobactérias do IHMT/UNL passou então a prestar apoio laboratorial diferenciado aos Hospitais da Região da Grande Lisboa no âmbito do diagnóstico laboratorial, epidemiologia e Saúde Pública da tuberculose, tendo firmado protocolos com os Serviços de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz, Hospital de Santa Maria, Hospital São Francisco Xavier, Hospital dos Capuchos, Hospital de Santa Cruz, Hospital Distrital de Cascais, Hospital Prisional de Caxias, Hospital de Setúbal, Hospital Distrital do Barreiro e Instituto Português de Oncologia, para receção de amostras para isolamento, identificação e teste de sensibilidade aos antibióticos através de novos sistemas baseados em biologia molecular e de novos sistemas automatizados de cultura que foram introduzidos em Portugal, e aqui avaliados, pela equipa liderada pelo Professor Hugo Lopes Ayres David [9, 10]. Durante este período, importa referir os importantes reforços técnico-científicos da Dras Laura Brum Cruz Martins e Filomena Pereira, na coordenação e supervisão

técnica do Laboratório de Micobactérias do IHMT/UNL, em complementaridade com a Dr^a Emília Prieto e um conjunto de jovens mestres e doutorandos que se foram formando e graduando ao longo do período de instalação e desenvolvimento do Laboratório, onde se contam Miguel Viveiros, Alexandra Galamba, Alexandra Fernandes, Diane Ordway, Marta Martins, Liliana Rodrigues e Diana Machado. Foi de entre o espírito empreendedor e de busca pela descoberta científica desta equipa que várias parcerias técnico-científicas com outros grupos de trabalho do IHMT/UNL e de outras Universidades, fizeram a diferença no panorama da luta contra a tuberculose em Portugal. Salienta-se a parceria com os colegas da saúde pública do IHMT/UNL, Professor Paulo Ferrinho e Dr^a Maria João Covas, e da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Professor Moniz Pereira e Dr^a Isabel Portugal, que permitiu descrever a epidemiologia da transmissão da tuberculose multirresistente na Região da Grande Lisboa no final dos anos 90 do século XX, e que foi a base para a descoberta e posterior reconhecimento pelas autoridades de saúde nacionais do problema que grassava por Portugal – a tuberculose multiresistente [8, 11].

Em 1999, aquando da saída do Professor Hugo Lopes Ayres David e da Dr^a Laura Brum para chefiar o Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Ricardo Jorge, inicia-se o processo de criação da Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Micobactérias do IHMT, chefiada pelo luso-americano Professor Leonard Amaral, acompanhado pela montagem e instalação, em colaboração com o Professor Vasconcelos Costa, do Laboratório de Segurança de Nível III (P3) para a Tuberculose do IHMT. Iniciada a sua construção em Março de 2000, a obra ficaria terminada em Março de 2001, nele passando a realizar-se todas as operações envolvendo micobactérias. A criação da Unidade de Ensino e Investigação e respetivo Laboratório de Segurança para Tuberculose e Micobacteriologia foi oficializada no Conselho Geral do IHMT/UNL em 2002. O seu planeamento estratégico e operacional tinha em vista a criação de novos programas de investigação biomédica aplicada à melhoria do diagnóstico laboratorial da tuberculose e outras doenças infecciosas micobacterianas que pudessem auxiliar a comunidade médica de Lisboa e os seus doentes. Assim, o objetivo principal desta Unidade centrou-se na oferta à comunidade de: a) ensino pós-graduado, de modo a contribuir para os programas académicos do IHMT e da UNL. Neles se enquadra a formação pré-graduada e pós-graduada em Microbiologia Médica e ações de formação para a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP); b) serviço à comunidade, de modo a melhorar o diagnóstico laboratorial da tuberculose; c) investigação aplicada, que contribua para o melhor conhecimento das doenças infecciosas e em particular da tuberculose com o objetivo último de promover a melhoria dos cuidados de saúde na Grande Lisboa e em Portugal e partilhar a experiência adquirida com os colegas dos países da CPLP.

O serviço à comunidade a prestar pela UEI de Micobactérias foi então definido tendo como objetivos o suprir das necessidades de resposta laboratorial aos doentes com tuberculose da

região da Grande Lisboa e da CPLP, em particular através da: a) identificação rápida da infeção por *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias; b) determinação rápida do perfil de resistências aos tuberculostáticos de *M. tuberculosis*; c) entrega destes resultados ao clínico em tempo útil (20 dias no máximo) para que fossem tomadas as medidas adequadas de tratamento, controlo e prevenção. A vertente da investigação aplicada passou a ter como objetivos a implementação, no terreno nacional e na CPLP, de novas tecnologias de diagnóstico micobacteriológico, o desenvolvimento de novos antibióticos com a participação de relevantes grupos de investigação química e biológica europeus e internacionais e a definição do perfil imunológico e resposta celular dos indivíduos infetados com *M. tuberculosis* quando evoluem para doença ativa, com a participação de relevantes grupos de investigação e empresas de biotecnologia europeias e norte-americanas [12-14].

Em Novembro de 2001 foi aprovado, no âmbito do programa de Apoio à Investigação Médica com Aplicação Prática do Concurso para Financiamento de Projetos de Saúde da Fundação Calouste Gulbenkian (FCG), o projeto “Grupo de Trabalho para a Tuberculose na Grande Lisboa - TB Task Force of Greater Lisbon” – Ref. SDH.IC.I.01.17, que envolveu os Laboratórios de doze Hospitais da Região da Grande Lisboa, trabalhando sob a organização do Laboratório de Micobactérias do IHMT. Este projeto teve como coordenador geral o Professor Leonard Amaral e como coordenador executivo o Dr. Miguel Viveiros (Figura 1, Foto 1). Iniciou-se então a parte laboratorial do projeto, denominado “Fast-Track Program”, integrando a participação dos Laboratórios de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz, Hospital S. Francisco Xavier, Hospital Fernando da Fonseca Amadora-Sintra, Hospital Condes de Castro-Guimarães Cascais, Hospital de S. Bernardo Setúbal, Hospital do Barreiro, Hospital de Santa Maria, Hospital Pulido Valente, Hospital Garcia da Orta, Hospital Curry Cabral e Hospitais de Santa Marta e Desterro. Este programa pretendeu criar a primeira rede integrada de laboratórios de micobacteriologia em Portugal, criando as condições para que fosse possível entregar ao clínico o resultado completo do diagnóstico micobacteriológico em 10 a 12 dias (max. 20 dias). Este programa contou com a consultoria de vários especialistas em doenças infecciosas e na área laboratorial, nacionais e estrangeiros, como o Prof. Doutor Hugo David, o Prof. Doutor Francisco Antunes, o Prof. Doutor Fernando Ventura, o Prof. Doutor Jaime Pina e o Prof. Doutor Max Salfinger (Director of Tuberculosis for the Wadsworth Centre of the New York Department of Health) [14-16] (Figura 1, Foto 2). Em Outubro de 2002 a FCG financia a expansão do projeto “Grupo de Trabalho para a Tuberculose na Grande Lisboa” à pesquisa de marcadores imunológicos de infeção por *M. tuberculosis* através do recurso à citometria de fluxo, com a aprovação do projeto “Pesquisa de novos marcadores de imunidade celular para a deteção precoce da infeção por *M. tuberculosis*”. Em Junho de 2003 estes projetos recebem o 2º Prémio de Investigação em Doenças Infecciosas da Fundação Glaxo-Smithkline - Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas, atribuído ao tra-

balho “A Implementação do Programa “TB-FAST-TRACK” de Combate à Tuberculose Multiresistente na Grande Lisboa”. Em Julho de 2004 a FCG financia o projeto “Diagnóstico Rápido da Tuberculose Multiresistente na Grande Lisboa”, com o qual se pretende aplicar as novas tecnologias de biologia molecular, em particular a tecnologia Inno-Lipa Rif.TB (Innogenetics, Belgica) para a deteção precoce da tuberculose multiresistente nos hospitais participantes no Grupo de Trabalho para a Tuberculose na Grande Lisboa [14-16]. Em 2003 junta-se ao grupo de trabalho da Unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias a Dr^a Isabel Couto, que veio consolidar a dinâmica da deteção molecular precoce de micobactérias no IHMT, em particular das micobactérias atípicas ou não-tuberculosas [17].

Numa primeira linha de abordagem, foi possível, no âmbito do Grupo de Trabalho para a Tuberculose da Grande Lisboa (2002 a 2007), melhorar e capacitar os laboratórios hospitalares da Grande Lisboa na deteção e caracterização molecular de estirpes de *M. tuberculosis* multiresistentes (MDR-TB) e extensivamente resistentes (XDR-TB), que persistem como uma das mais importantes ameaças à saúde humana a nível mundial. Declarada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma emergência global, a tuberculose multiresistente é hoje um desafio ao sucesso dos programas de luta contra a tuberculose implementados por todo o mundo. Portugal tem uma das mais elevadas taxas de novos casos de TB da Europa Ocidental, possuindo ainda a mais elevada frequência de MDR-TB. Ainda mais preocupante é o facto de 24% de todos os casos de MDR-TB reportados para 2005-2006 serem de estirpes extensivamente resistentes aos antibióticos (XDR-TB), uma taxa que em 2007 ascendeu a 48% de todos os casos de MDR-TB detectados [18,19].

Graças aos esforços desenvolvidos durante o projeto “Grupo de Trabalho para a Tuberculose na Grande Lisboa - TB Task Force of Greater Lisbon”, a maioria dos laboratórios hospitalares da Grande Lisboa passou a operar em interligação, usando as mesmas tecnologias e critérios propostos e estabelecidos no grupo de trabalho, definindo linhas orientadoras comuns no processamento de amostras, isolamento de *M. tuberculosis*, identificação molecular e testes de sensibilidade aos antibióticos. Em paralelo, iniciou-se a aplicação de técnicas de amplificação e hibridação de ácidos nucleicos diretamente aos produtos respiratórios dos doentes bacilíferos, em paralelo com a baciloscopia. Além da deteção precoce de DNA de *M. tuberculosis* diretamente a partir da amostra do doente bacilífero, esta abordagem permite a deteção de mutações que conferem resistência aos antibióticos e que podem ser usadas como marcadores preditivos de multiresistência [14,15,19]. A importância deste algoritmo de trabalho e a sua mais-valia para a melhoria no tratamento destes doentes foi reconhecido no Encontro sobre Tuberculose, realizado no âmbito da Presidência Portuguesa da EU, em Lisboa em Julho de 2007. Neste encontro reconheceu-se o papel fundamental do laboratório de Micobacteriologia no suporte aos programas nacionais de controlo da tuberculose e que a função central e muitas vezes negligenciada destas estruturas deve ser reforçada através de uma melhoria dos meios de diagnóstico micobacte-

riológico, com particular ênfase na implementação de métodos rápidos para o diagnóstico laboratorial de TB e M/XDR-TB. A experiência portuguesa na articulação clínico-laboratorial no contexto dos programas de luta contra a tuberculose e a participação ativa da UEI de Micobactérias do IHMT/UNL nas reuniões de trabalho consolidou o documento final que viria a ser publicado sob o título “The Portuguese Presidency of the European Union. Health Strategies in Europe. Parallel Session: A European Strategy for Multidrug Resistant Tuberculosis. Lisboa, 12-13 Julho 2007. Framework Action Plan to fight Tuberculosis in the European Union. European Center for Diseases Control. Estocolmo.” Fevereiro 2008 (http://ecdc.europa.eu/pdf/080317_TB_Action_plan.pdf).

Na sequência desta reunião e da elaboração do documento referido anteriormente, os países da União Europeia iniciaram a implementação em rotina de métodos moleculares para a rápida deteção de MDR-TB, inspirando-se em parte na experiência Portuguesa. Já em 2008, a Direção Geral da Saúde do Ministério da Saúde de Portugal reconheceu a importância desta abordagem na luta contra a disseminação da tuberculose resistente aos antibióticos no nosso país, tendo emitido a Circular Normativa N° 12/DSCS/PNT, onde se preconiza que, no âmbito do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose e de acordo com o objetivo programático de controlo da Tuberculose Multirresistente, seja requisitado o teste de deteção molecular de multirresistência diretamente na amostra clínica, sempre que se suspeite de tuberculose multirresistente, sendo considerados casos suspeitos todas as pessoas com tratamentos antituberculose anteriores, contactos com doentes de tuberculose multirresistente, ou populações de risco acrescido de multirresistência, nomeadamente profissionais de saúde, infetados pelo VIH, toxicod dependentes, reclusos, imigrantes e residentes em áreas de alta prevalência de tuberculose multirresistente. Certamente contribuiu-se para que as taxas de 20 a 30% de MDR-TB que se verificavam na região da Grande Lisboa na década de noventa do século XX tenham diminuído para valores médios entre os 3 a 5% na primeira década deste século, resultados estes que não teriam sido possíveis sem um empenho significativo da Direção Geral de Saúde na reorganização da Luta Contra a Tuberculose em Portugal. Saliente-se o marco histórico da redução da taxa de incidência nacional de tuberculose se situar, pela primeira vez na nossa história, abaixo dos 20 casos por 100.00 habitantes em 2014 – taxa estimada de 18,7 [20]. Tal coloca pela primeira vez o nosso país no grupo dos países de baixa-média incidência, de acordo com os critérios epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde [20,21]. Se em 2002 a Direção Geral da Saúde reportava 41 casos novos de tuberculose por 100.00 habitantes, com 12,7 % de casos de tuberculose multirresistente, em 2013 reportava 20.1 novos casos por 100.000 habitantes com cerca de 0.87% casos de tuberculose multirresistente. Em 2014 finalmente a taxa de incidência nacional estimada será de 18,7 casos com 0.30% de casos de tuberculose multirresistente notificados a nível nacional [21-23]. No entanto, apesar da redução significativa na incidência de tuberculose nos últimos anos a nível na-

cional, Porto e Lisboa continuam longe da média nacional sendo as cidades com maior incidência de tuberculose do país. Em 2013, ocorreram 257 casos de tuberculose na cidade de Lisboa (taxa de incidência de 49,4/100.000 habitantes) e 119 casos na cidade do Porto (taxa de incidência de 52,9/100.000 habitantes), com taxas de multirresistência de 3 a 5% [21-23]. O principal problema continua a ser a prevalência de tuberculose multirresistente e, em particular, a tuberculose extensivamente resistente. Dos casos de tuberculose multirresistente notificados em 2013 (n=12), 42% corresponderam a tuberculose extensivamente resistente (n=5), continuando a ser uma preocupação nos grandes centros urbanos de Lisboa, Porto e também Setúbal [22]. A importância desta situação e sobretudo a necessidade de se prevenir o seu agravamento, levou à aprovação do financiamento em Maio de 2009, pela Fundação Calouste Gulbenkian, de um terceiro projeto intitulado “Diagnóstico e Epidemiologia Molecular de M/XDR-TB na Grande Lisboa: a Deteção Precoce na Prevenção da Emergência e Disseminação de Estirpes de *M. tuberculosis* Extensivamente Resistentes” sob a coordenação do IHMT/UNL, tendo como parceiros o Centro Hospitalar de Lisboa Central (Hospital Santa Maria) e o Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (Hospital Egas Moniz). Este projeto permitiu testar a utilização de diferentes metodologias na deteção precoce de M/XDR-TB, confirmando-se o papel crucial dos métodos moleculares no diagnóstico laboratorial atempado destas infeções [24].

O estudo da diversidade genética das estirpes de *M. tuberculosis* isoladas ao longo destes anos de estudo permitiu-nos ainda observar que a maioria das estirpes multirresistentes que circulam em Lisboa pertence a um grupo geneticamente relacionado [11, 24-27]. Este grupo ou “cluster” de *M. tuberculosis* altamente virulento, designado por Família Lisboa, foi inicialmente isolado e identificado no Laboratório de Micobactérias do IHMT/UNL nos últimos anos da década de noventa e caracterizado por epidemiologia molecular, com recurso à técnica IS6110-RFLP e posteriormente por VNTR-MIRU, pela equipa da Dra Isabel Portugal (Faculdade de Farmácia de Lisboa, FF/UL) com a qual se colabora há vários anos [11,26]. Este “cluster” tem sido detetado em todo o território nacional, com particular incidência na área de Lisboa. Os dados moleculares recentemente colhidos sugerem que este se estabeleceu na comunidade em Portugal, sendo que a sua prevalência entre as estirpes de *M. tuberculosis* resistentes em Portugal é de cerca de 90%, e que, destas estirpes, cerca de 20 a 40% são extensivamente resistentes [22,26,27]. Assim, a Família Lisboa é hoje uma ameaça para o controle da tuberculose em Portugal, uma vez que a sua prevalência nos últimos anos sugere que estas estirpes possuem vantagens seletivas sobre outras estirpes de diferentes origens, exibindo ainda características genéticas que as tornam mais predisponentes a adquirir multirresistência, tal como recentemente evidenciado pelo trabalho de um consórcio internacional de sequenciação do genoma completo destas estirpes [27].

Em paralelo com os avanços da biologia molecular, a utilização de sistemas automatizados de isolamento e cultura baseados em

detetores fluorométricos ou colorimétricos mais sensíveis, permite agora obter culturas positivas para micobactérias de forma mais célere, permitindo igualmente caminhar no sentido da automatização da determinação da concentração mínima inibitória de cada antibacilar, para cada isolado de um doente, em alternativa ao antibiograma clássico que ainda hoje está “cl clinicamente validado” apenas para *M. tuberculosis* e para um número restrito de antibacilares. São os primeiros passos no sentido da medicina personalizada em tuberculose.

Saber qual a concentração mínima inibitória para cada isolado permite que se considere, com mais frequência, o aumento da dose de certos antibacilares mais eficazes face aos casos de mutirresistência, em alternativa à sua substituição por outros. Por outro lado, a seleção de uma terapia eficaz para o doente infetado com MDR-TB ou XDR-TB poderá vir a ser orientada à priori pelo laboratório de Micobacteriologia, através do isolamento de macrófagos do doente, pela fagocitose experimental da micobactéria isolada do mesmo doente e da apresentação ao macrófago infetado das melhores terapias combinadas (devidamente consubstanciada pela determinação da concentração mínima inibitória do bacilo isolado, para cada antibacilar) de forma a determinar-se qual a combinação terapêutica mais eficaz para cada doente e para cada bacilo, poupando-se tempo e otimizando a melhor solução terapêutica [28]. O diagnóstico rápido e a terapêutica personalizada são o futuro do combate à tuberculose, sendo a forma mais eficaz de se combater a tuberculose resistente aos antibacilares [16,28].

Sintetizando tudo o que anteriormente foi exposto, conclui-se que o Laboratório de Micobacteriologia do IHMT desempenhou um papel importante no controlo e prevenção da tuberculose, e em particular da tuberculose multirresistente, na região da Grande Lisboa e em Portugal, através da implementação de novas metodologias de diagnóstico micobacteriológico que permitem um diagnóstico laboratorial mais rápido e eficiente de forma a dar uma resposta em tempo útil para o efetivo tratamento do doente com tuberculose multirresistente. A experiência do Grupo de Trabalho para a Tuberculose na Grande Lisboa liderado pelo IHMT/UNL foi pioneira nesta abordagem, tendo contribuído significativamente para a definição das prioridades e avanços tecnológicos subsequentes, que culminaram nos sistemas de deteção molecular direta que estão hoje disponíveis no mercado, em Portugal e no mundo. Assim, é possível ter uma rotina de diagnóstico micobacteriológico que reduz o tempo de resposta do laboratório de meses para semanas no que diz respeito ao teste de sensibilidade aos antibióticos e de meses para dias no que diz respeito à identificação do bacilo. Permite ainda informar o clínico, 24 horas após a colheita da amostra, do risco de se tratar de um caso de tuberculose multirresistente. Neste contexto, a deteção direta por amplificação de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis* e de pesquisa de mutações ligadas à resistência à rifampicina, nas amostras dos doentes bacilíferos, como indicador precoce de multirresistência, mostrou-se altamente eficaz e preditivo. Associado a estes avanços, a utilização de sistemas automatizados de cultura micobacteriana com detetores mais

sensíveis e eficientes permite hoje obter isolamentos mais céleres, possibilitando igualmente caminhar-se para a automatização da determinação da concentração mínima inibitória para cada antibacilar, em cada isolado do doente, abrindo as portas à medicina personalizada do futuro [28,29].

Fruito desta experiência bem-sucedida de mais de 10 anos, em Setembro de 2011, o Secretariado Executivo da Comunidade dos Países de Língua Portuguesa, no âmbito do Plano Estratégico de Cooperação em Saúde da Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP) e a Fundação Calouste Gulbenkian, ao abrigo do Programa de Apoio ao Desenvolvimento e Cooperação com África, aprovam e financiam o projeto “Formação em Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose, ForDILAB TB”, projeto que reúne a Fundação Calouste Gulbenkian, a CPLP, o Instituto de Higiene e Medicina Tropical e o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Figura 1, Fotos 3 e 4). Este projeto contou com o apoio e alto-patrocínio do Representante Especial para Tuberculose do Secretário-geral das Nações Unidas, Sua Ex^a o Presidente da República Portuguesa, Dr. Jorge Sampaio. De 2012 a 2014, este projeto permitiu o intercâmbio de experiências de implementação de novas tecnologias e de criação de redes de laboratórios de micobacteriologia, de onde se destaca a missão de apoio à instalação do Laboratório de Tuberculose do Instituto Nacional Saúde Pública da Guiné-Bissau em Outubro de 2013 (Figura 1, Foto 5). Operacionalizado em íntima relação com os desafios colocados pela coinfeção pelo VIH, aproximando Programas de Luta Contra a Tuberculose e Contra o VIH nos países da CPLP, do qual o IHMT/UNL é ponto focal para a saúde, este programa de capacitação local permitiu formar mais de 60 profissionais de saúde na área de Micobacteriologia - Tuberculose – e VIH.

Esta e outras experiências levaram-nos a procurar dar resposta a uma necessidade constante de novas ferramentas que permitam o diagnóstico rápido da tuberculose, em particular em países com poucos recursos, com ênfase no desenvolvimento de métodos que dispensem a utilização de equipamento especializado ou mesmo o fornecimento constante de corrente elétrica, estabelecendo um conjunto de novas colaborações. Neste sentido, a utilização de novas abordagens tecnológicas, em particular a utilização de nanosondas de ouro, revelou-se particularmente atrativa. O potencial desta nova abordagem espelha-se na atribuição do prémio para melhor comunicação em painel na área da Engenharia Celular e de Tecidos, Biomateriais e Nanobiotecnologias no Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia em 2009 (MicroBiotec’09, Vilamoura, Portugal) e três anos mais tarde, na atribuição do Prémio de Mérito Santander/Totta – Universidade Nova de Lisboa, pelo trabalho “NanoTB - Nanodiagnóstico for XDRTB at point-of-need”, no qual se reconhece a excelência e o potencial do trabalho desenvolvido pelas equipadas coordenadas por Miguel Viveiros (IHMT/UNL) e Pedro Baptista (FCT/UNL) (Figura 1, Foto 6).

Procura-se assim auxiliar os programas nacionais e locais de Luta contra a Tuberculose, honrando as experiências do passado

do IHMT, ao proporcionar melhor saúde para os trópicos, agora transpondo o saber e a experiência adquirida para um contexto de cooperação para o desenvolvimento e saúde global, onde o passado se revisita e o futuro se constrói.

Agradecimentos

Os trabalhos e as contribuições para a Luta Contra a Tuberculose em Portugal e na CPLP aqui descritas não teriam sido possíveis sem o apoio e a dedicação de todos os clínicos, enfermeiros, técnicos de laboratório e restante pessoal de saúde dos hospitais, centros de saúde e centros de diagnóstico pneumológico de Lisboa, de Portugal e dos Países da CPLP, que neles partici-

param. O apoio e incentivo permanente da Fundação Calouste Gulbenkian foram inestimáveis, bem como o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia de Portugal e das empresas fornecedoras e representantes de reagentes e equipamentos de diagnóstico laboratorial e de biossegurança para a Tuberculose como a Quilaban e a Fisher Scientific. O vosso contributo foi da maior importância para a prossecução dos objetivos do Grupo de Trabalho para a Tuberculose da Grande Lisboa e para o controlo da tuberculose e da tuberculose resistente em Portugal. Por fim há que salientar o apoio e colaboração do Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose da Direção Geral de Saúde do Ministério da Saúde de Portugal, na pessoa dos seus responsáveis passados e presentes, Dr. Fonseca Antunes e Doutora Raquel Duarte.

Bibliografia

- Rosa AB (1979). Da A.N.T. ao S.L.A.T.: História Sumária da Instituição - 1899-1979, Serviço de Luta Antituberculosa Lisboa.
- Pina J (2000). A tuberculose através dos seus marcos históricos, in A Tuberculose na viragem do milénio, Edições Lidel, Lisboa, pp. 9-18.
- Salazar-Leite A, Bastos da Luz JV, Pinto Nogueira J (1953). Relatório da Missão de Combate à Lepra na Província Ultramarina da Guiné: da 5ª cadeira do IMT -1951-1952. An Inst Med Trop 10: 81-163.
- Salazar-Leite A, Franco L, Sobral FC, Pinto A, Santos A (1958). Relatório da Missão de Prospecção à Lepra em Angola. An Inst Med Trop 15: 335-356.
- Fraga de Azevedo J, Gândara AF, Ferreira AP (1958). Sobre a incidência da tuberculose na província de Timor avaliada pela cuti-reação. An Inst Med Trop 15: 181-188.
- Ferreira AP, Gândara AF (1958). Subsídios para o estudo da incidência da tuberculose na província de Macau. An Inst Med Trop 15: 1005-1014.
- Abranches P (2004). O Instituto de Higiene e Medicina Tropical: um século de história: 1902-2002. Edição Centro Editorial e Livreiro da Ordem dos Médicos, 66pp.
- Covas MJ, Brum L, Portugal I, Bernardo JL, Viveiros M, David, HL, Ferrinho P (1998). Estudo epidemiológico de um surto de tuberculose multiresistente na área metropolitana de Lisboa. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, Ano 21, Nº 1-2, 38-44.
- Prieto, E, Pacheco, T, Viveiros, M, Bettencourt, R, Brum, L and Exposto, F (1996). Mycobacterial infection in hemocultures from HIV patients using BACTEC 460TB system. Revista Portuguesa de Pneumologia, Vol II, Nº6: 403-407.
- Viveiros M, Pinheiro S, Moreira P, Pacheco T and Brum L (1999). Evaluation of a commercial Ligase Chain Reaction Assay for the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 3(6), 1-7.
- Portugal I, Covas MJ, Brum L, Viveiros M, Ferrinho P, Moniz-Pereira J, David HL (1999) Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. Int. J. Tuberc Lung Dis. 3(3):207-13.
- Ordway DJ, Costa L, Martins M, Silveira H, Amaral L, Arroz MJ, Ventura FA, Dockrell HM Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. J Infect Dis. 2004 Aug 15;190(4):756-66.
- Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Bettencourt R, Almeida J, Martins M, Kristiansen JE, Molnar J and Amaral L. (2003) Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(3):917-922.
- Viveiros M, Leandro C, Rodrigues L, Almeida J, Bettencourt R, Couto I, Carriho L, Diogo J, Fonseca A, Lito L, Lopes J, Pacheco T, Pessanha M, Quirim J, Sancho L, M Salfinger, Amaral L (2005). Direct Application of the INNO-LiPA Rif.TB Line-Probe Assay for Rapid Identification of *M. tuberculosis* Complex Strains and Detection of Rifampin Resistance in 360 Smear-Positive Respiratory Specimens from an Area of High Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis. J Clin Microbiol 43: 4880-4884.
- Viveiros M, Leandro C, Rodrigues L, Almeida J, Bettencourt R, Couto I, Carriho L, Diogo J, Fonseca A, Lito L, Lopes J, Pacheco T, Pessanha M, Quirim J, Sancho L, Salfinger M, Amaral, L (2006). Diagnóstico precoce da tuberculose multiresistente (TBMR). In: Tuberculose – Impacto da Infecção VIH. Pina J. (ed.), Soc. Port. de Pneumologia – Hosp. Pulido Valente – GlaxoSK, Lisboa, Portugal, p.83-99.
- Viveiros M, Martins M, Couto I, Rodrigues L, Machado D, Portugal I, Amaral L (2010). Molecular tools for rapid identification and novel effective therapy against MDR-TB/XDR-TB infections. Expert Reviews on Anti-Infective Therapies 8:465-80.
- Couto I, Machado D, Viveiros M, Rodrigues L, Amaral L (2010). Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. Clin Microbiol Inf 16:1161-1164.
- Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose (PNT). Ponto da situação epidemiológica e de desempenho ano 2007, Direção Geral Saúde, 21 Março 2008. Ministério da Saúde, Lisboa, Portugal.
- Costeira J, Pina J (2007). A tuberculose multiresistente e a rainha vermelha – a rapidez do diagnóstico é decisiva. Rev. Port. Pneum XIII: 869.
- Direção-Geral da Saúde (2015). Portugal Infecção VIH/SIDA e Tuberculose em números – 2015. Programa Nacional para a Infecção VIH/SIDA. Direção-Geral da Saúde, Lisboa, Portugal. Março 2015.
- World Health Organization: Global tuberculosis report 2013. WHO/HTM/TB/2014.11. Geneva, World Health Organization, 2014.
- Direção-Geral da Saúde (2014). Portugal Infecção VIH/SIDA e Tuberculose em números – 2014. Programa Nacional para a Infecção VIH/SIDA. Direção-Geral da Saúde, Lisboa, Portugal. Dezembro 2014.
- Direção-Geral da Saúde (2013). Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose. Ponto da Situação Epidemiológica e de Desempenho de 2012. Relatório para o Dia Mundial da Tuberculose. Avaliação preliminar em Março 2013. Direção-Geral da Saúde, Lisboa, Portugal; 2013.
- Machado D, Viveiros M, Francisco S, Ramos J, Serra C, Pacheco T, Marques T, Lito LM, Melo-Cristino J, Couto I Detecção Direta de MDR-TB em Portugal: Métodos e Aplicações Comerciais - A experiência do IHMT. Comunicação no Workshop "Multidrug-Resistant Tuberculosis", 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT/ IUNL), Lisboa, Portugal, 20 Abril 2013.
- Portugal I, Brum L, Viveiros M, Moniz-Pereira J, David HL (1998). Tipificação genética de estirpes multiresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas na região de Lisboa. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas. 21: 54-59.
- Perdigão J, Macedo R, Silva C, Machado D, Couto I, Viveiros M, Jordão L, Portugal I. (2013). From multidrug-resistant to extensively drug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: the stepwise mode of resistance acquisition. J. Antimicrob Chemother 68: 23-33.
- Perdigão J, Silva H, Machado D, Macedo R, Maltez F, Silva C, Jordão L, Couto I, Mallard K, Coll F, Hill-Cawthorne G, McNeerney R, Pain A Clark TG, Viveiros M, Portugal I (2014). Unraveling *Mycobacterium tuberculosis* genomic diversity and evolution in Lisbon, Portugal, a highly drug resistant setting. BMC Genomics. 15:991.
- Martins M, Viveiros M, Amaral L (2008). The TB laboratory of the future: macrophage-based selection of XDR-TB therapeutics. Future Microbiology. 3:135-44.
- Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, Fauville-Dufaux M, Hoffner S, Richter E, Perez del Molino ML, Cirillo D, van Soolingen D, Boettger EC (2015). Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. J Antimicrob Chemother 70:686-696.