

CPLP-TB: uma nova ferramenta de vigilância transnacional da tuberculose no espaço lusófono

CPLP-TB: a new tuberculosis transnational surveillance tool for the lusophone community

João Perdigão

iMed.U LISBOA – Instituto de Investigação do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Carla Silva

iMed.U LISBOA – Instituto de Investigação do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Jaciara Diniz

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Catarina Pereira

iMed.U LISBOA – Instituto de Investigação do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Diana Machado

Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade Nova de Lisboa, UNL, Lisboa, Portugal

Jorge Ramos

Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade Nova de Lisboa, UNL, Lisboa, Portugal

Hugo Silva

iMed.U LISBOA – Instituto de Investigação do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Fernanda Abilleira

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Clarice Brum

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Ana J. Reis

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Maíra Macedo

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

João L. Scaini

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Ana B. Silva

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Leonardo Esteves

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Porto Alegre, Brasil

Rita Macedo

Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Fernando Maltez

Serviço de Doenças Infecciosas, Hospital de Curry Cabral, Lisboa, Portugal

Sofia Clemente

Hospital da Divina Providência, Serviço de Doenças Infecciosas, Luanda, Angola

Elizabeth Coelho

Programa Nacional de Controlo da Tuberculose, Ministério da Saúde de Moçambique, Moçambique

Sofia Viegas

Instituto Nacional de Saúde, Ministério da Saúde de Moçambique, Moçambique

Paulo Rabna

Instituto Nacional de Saúde Pública/Projecto de Saúde de Bandim (INASA/PSB), Bissau, Guiné-Bissau

Amábélia Rodrigues

Instituto Nacional de Saúde Pública/Projecto de Saúde de Bandim (INASA/PSB), Bissau, Guiné-Bissau

Nuno Taveira

iMed.U LISBOA – Instituto de Investigação do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica, Portugal

Luísa Jordão

Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Afrânio Kritski

Academic Tuberculosis Program, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

José Lapa e Silva

Thoracic Diseases Institute, Federal University of Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brazil

Igor Mokrousov

Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics (former Laboratory of Molecular Microbiology), St Petersburg Pasteur Institute, St Petersburg, Russia

David Couvin

WHO Supranational TB Reference Laboratory, Tuberculosis and Mycobacteria Unit, Institut Pasteur de la Guadeloupe, Morne Jolivière Abymes, Guadeloupe, France

Nalin Rastogi

WHO Supranational TB Reference Laboratory, Tuberculosis and Mycobacteria Unit, Institut Pasteur de la Guadeloupe, Morne Jolivière Abymes, Guadeloupe, France

Isabel Couto

Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade Nova de Lisboa, UNL, Lisboa, Portugal

Arnab Pain

Pathogen Genomics Laboratory, BESE Division, King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia

Ruth Mc Nerney

Lung Infection and Immunity Unit, UCT Lung Institute, University of Cape Town, Groote Schuur Hospital, Observatory, 7925, Cape Town, South Africa

Taane G Clark

London School of Hygiene & Tropical Medicine, Keppel Street, London, WC1E 7HT, United Kingdom

Andrea von Groll

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Elis R. Dalla-Costa

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Porto Alegre, Brasil

Maria Lúcia Rossetti

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Porto Alegre, Brasil Universidade Luterana do Brasil (ULBRA/RS), Porto Alegre, Brasil

Pedro E. A. da Silva

Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Miguel Viveiros

Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine, GHTM, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade Nova de Lisboa, UNL, Lisboa, Portugal

Isabel Portugal

iMed.U LISBOA – Instituto de Investigação do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo

A Tuberculose (TB) permanece um grave problema de saúde pública na Comunidade dos Países de Língua Portuguesa (CPLP). Apesar da ampla variância da incidência da TB nos seus estados-membro e de um fluxo migratório contínuo entre os países que integram este grupo, existe uma enorme lacuna no que diz respeito ao conhecimento da estrutura populacional conjunta do *Mycobacterium tuberculosis* e circulação de estirpes entre estes países.

Para fazer face a esta necessidade, foi agregado e analisado o maior conjunto de dados respeitante à diversidade genotípica e resistência fenotípica na CPLP que compreende um total de 1447 isolados clínicos, incluindo 423 isolados multirresistentes de cinco países da CPLP.

Por forma a tornar estes dados disponíveis para a comunidade científica e autoridades de saúde pública, foi desenvolvida a CPLP-TB (disponível em <http://cplp-tb.ff.ulisboa.pt>), uma base de dados disponível online e provida de aplicativos para análise exploratória do conteúdo. Como ferramenta de saúde pública, espera-se que venha a contribuir para um conhecimento mais aprofundado da estrutura populacional do *M. tuberculosis* e circulação de estirpes na CPLP de forma a apoiar a avaliação de risco e tendências específicas para diversos clones.

Palavras Chave:

CPLP, tuberculose, base de dados, epidemiologia, genotipagem.

A tuberculose (TB) afigura-se ainda nos dias de hoje como um dos mais graves problemas de saúde pública a nível global. Volvidos mais de 130 anos após o anúncio da descoberta do seu agente etiológico - o *Mycobacterium tuberculosis*, e da indubitável comprovação de que esta se trata de facto de uma doença infecciosa com enorme potencial de disseminação na comunidade, a TB é hoje, ainda, a décima causa de morte a nível mundial. São aproximadamente 10 milhões o número de novos casos estimados pela Organização Mundial de Saúde em 2017, que para o mesmo período estima terem ocorrido 1.6 milhões de mortes devido a esta patologia. [1] Num contexto lusófono, importa destacar a natureza assimétrica da distribuição desta doença pelos estados membros da Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP - <https://www.cplp.org>). A taxa de incidência da TB nestes países varia desde 20 casos por cada 100 000 habitantes/ano, em Portugal, e 551 casos por cada 100 000 habitantes/ano, em Moçambique, em 2017. Mesmo em Portugal, país que recentemente ultrapassou com sucesso o limiar de baixa-intermédia incidência, ressalva-se a incidência elevada quando contextualizada com os demais países da Europa Ocidental e União Europeia no qual está inserido. [2] Por outro lado, países como Angola e Moçambique figuram atualmente no topo das listas prioritárias da Organização Mundial de Saúde para a TB, infeção HIV/SIDA e TB multirresistente, com o Brasil a figurar também nas duas primeiras categorias. [1] Mais, a relevância global

Abstract

Tuberculosis (TB) remains a major health problem within the Community of Portuguese Language Speaking Countries (CPLP). Despite the marked variation in TB incidence across its member-states and continued human migratory flux between countries, a considerable gap in the knowledge on the *Mycobacterium tuberculosis* population structure and strain circulation between the countries still exists.

To address this, we have assembled and analyzed the largest CPLP *M. tuberculosis* molecular and drug susceptibility dataset, comprised by a total of 1447 clinical isolates, including 423 multidrug-resistant isolates, from five CPLP countries.

To make this data available to the scientific community and public health authorities we developed CPLP-TB (available at <http://cplp-tb.ff.ulisboa.pt>), an online database coupled with web-based tools for exploratory data analysis. As a public health tool, it is expected to contribute to improved knowledge on the *M. tuberculosis* population structure and strain circulation within the CPLP, thus supporting the risk assessment of strain-specific trends.

Key Words:

CPLP, tuberculosis, database, epidemiology, genotyping.

da CPLP tem vindo paulatinamente a angariar interesse global dada a sua dimensão e número de habitantes que conjuntamente alberga: 10 742 000 Km² de área terrestre contendo cerca de 258 466 109 habitantes.

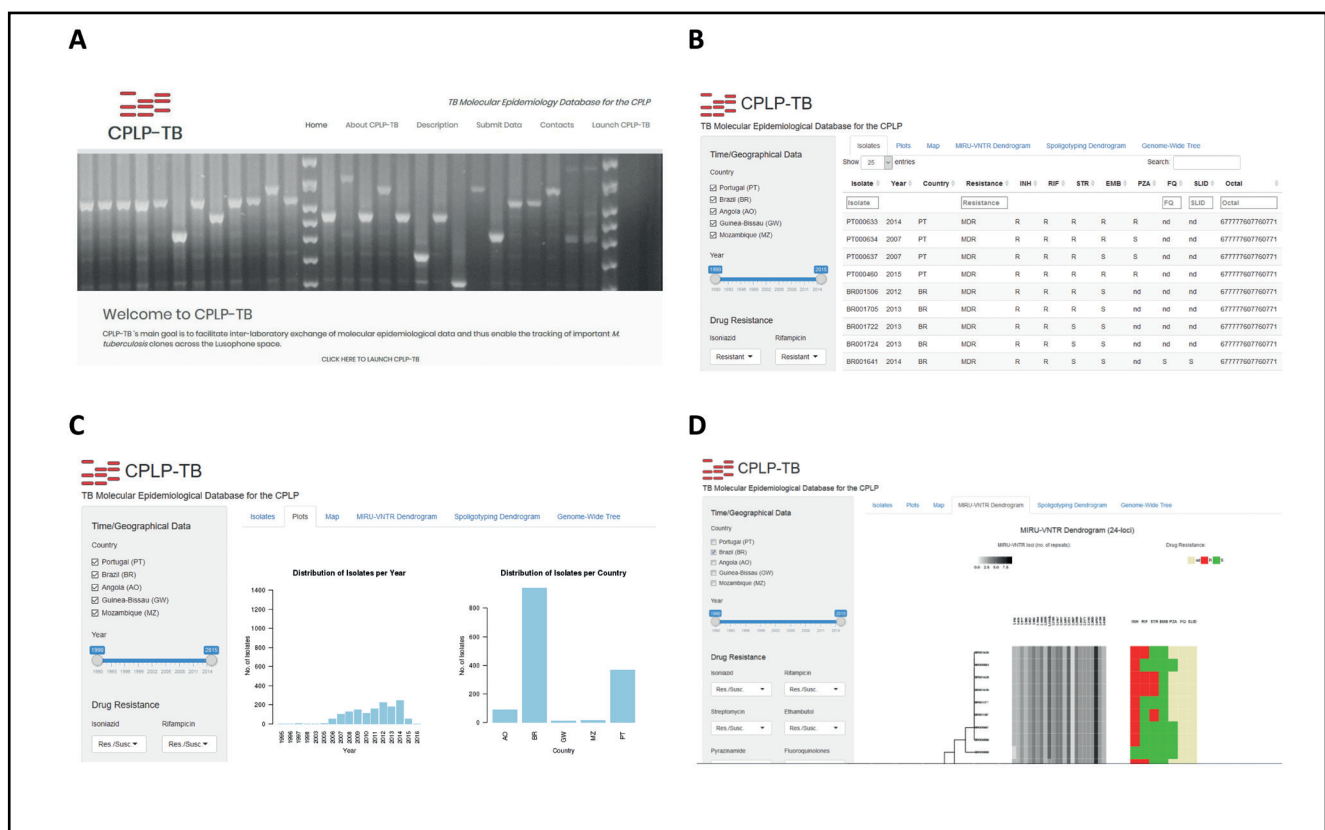
Além do denominador comum da lusofonia, o passado histórico partilhado pelos seus estados-membro geram um sistema migratório associado a um fluxo humano que pode servir de base para a disseminação de clones de *M. tuberculosis* endémicos de regiões específicas, mas que, não obstante esse facto, podem gerar casos secundários fora dessas mesmas regiões funcionando este mesmo sistema migratório como veículo de transmissão intra e intercontinental de estirpes a países extra-CPLP. [3]

Neste contexto, a vigilância epidemiológica com recurso a métodos moleculares de última geração oferecem a possibilidade de estudar a transmissão e expansão clonal de estirpes na comunidade. Vários métodos baseados na caracterização de elementos repetitivos no genoma do *M. tuberculosis* foram desenvolvidos e mais recentemente a sequenciação de última geração tem vindo a fornecer um poder discriminatório insuperável. [4] Em Portugal, a epidemiologia molecular da TB tem vindo a ser estudada desde o princípio dos anos 90 no Laboratório de Micobacteriologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa em colaboração com o Instituto de Higiene e Medicina Tropical. [5, 6] A perspetiva molecular que tem vindo a ser obtida tem-se mostrado especialmente importante na compreensão

da disseminação e emergência da resistência em Portugal. A FFUL/IHMT tem contudo vindo também a desenvolver esforços na caracterização de estirpes clínicas oriundas de países africanos de língua portuguesa, tendo em 2016 publicado o primeiro estudo relativo à diversidade genética de estirpes em Angola. [7] Recentemente, e através de colaborações estabelecidas com o Brasil de onde se destacam a Universidade Federal do Rio Grande e o Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Rio Grande do Sul, foi possível efetuar o primeiro estudo comparativo envolvendo cinco países ao nível da CPLP. [8] No estudo referido foi possível identificar seis clusters transnacionais que apoiam a expansão clonal entre estados-membro da CPLP. De facto, a estrutura populacional observada aparentemente reflete o passado histórico que envolve

este grupo de países e o fluxo humano no espaço lusófono ao longo dos últimos séculos e que se reflete na elevada prevalência de estirpes da família *Latin American and Mediterranean* (LAM). [9]

Neste contexto, e uma vez que se trata de um tipo de estudo que requer uma monitorização contínua e um veículo eficaz de disseminação do conhecimento gerado, foi desenvolvida a primeira plataforma online que funciona como base de dados e aplicativo para a análise da disseminação e da diversidade genética do *M. tuberculosis* no contexto lusófono (CPLP-TB, disponível em <http://cplp-tb.ff.ulisboa.pt>). Implementada na linguagem R/Shiny, a CPLP-TB dispõe de vários aplicativos que permitem analisar os dados aí depositados (Figura 1). Estes aplicativos vão desde a vista de tabela, passando pela construção de gráficos e mapa coroplético até à



A base de dados CPLP-TB encontra-se disponível em <http://cplp-tb.ff.ulisboa.pt> e alberga diferentes aplicativos para análise exploratória de dados. A página inicial da CPLP-TB (painel A) apresenta um menu com ligações para várias páginas com informação acerca da base de dados, incluindo descrição quantitativa e instruções acerca do modo de submissão de dados na CPLP-TB. Nesta mesma página de entrada existe um link para aceder à base de dados e respetivos aplicativos que se encontram organizados numa barra lateral com diversos filtros e seis separadores: vista de tabela (painel B), que permite visualizar cada isolado clínico e respetivas características num formato tabular; vista de gráficos (painel C), que apresenta várias estatísticas e contagens agregadas de acordo com os filtros selecionados e apresentadas em formato gráfico; vista de mapa, que mostra sob a forma de um mapa coroplético interativo a distribuição dos isolados por país; vista de dendrograma MIRU-VNTR (painel D) que permite visualizar um dendrograma baseado em MIRU-VNTR de 24-loci das estirpes selecionadas de acordo com os filtros selecionados no painel lateral conjuntamente com informação acerca da suscetibilidade a diversos antibióticos; vista de dendrograma de spoligotyping, semelhante ao anterior mas baseado em spoligotyping; e, vista de árvore filogenética baseada em SNPs à escala genómica de todos os isolados clínicos sequenciados e que se encontram na CPLP-TB, sendo realçados aqueles que são selecionados através da barra lateral.

Figura 1

construção de dendrogramas. O acesso é livre e o utilizador pode implementar diversos filtros (país de origem, resistências, clades filogenéticos, etc.) que imediatamente têm reflexo nos dados que são apresentados. Presentemente, a CPLP-TB alberga 1447 isolados clínicos oriundos de 5 países distintos (Angola, Brasil, Guiné-Bissau, Moçambique e Portugal) dos quais 1239 isolados se encontram genotipados por spoligotyping, 802 por MIRU-VNTR de 15-loci e 381 por MIRU-VNTR de 24-loci. [8]

Nesta primeira fase de implementação, a CPLP-TB encontra-se especialmente orientada para a análise de marcadores moleculares clássicos, i.e., aqueles que não envolvem sequenciação genómica. À medida que se transita para a tipagem molecular baseada na sequenciação genómica de última geração, espera-se que a CPLP-TB tenha um papel primordial neste processo. A isto se deve o facto de atualmente ser impossível obter perfis de MIRU-VNTR a partir das sequências geradas pelas tecnologias de sequenciação mais usuais. O mesmo não acontece com o Spoligotyping, mas existe atualmente no conjunto da CPLP um enorme manancial de dados genotípicos baseados em MIRU-VNTR cuja articulação e ligação com dados genómicos poderá ser perdida se não se puder associar perfis genotípicos baseados em MIRU-VNTR a perfis genómicos baseados em polimorfismos de base única (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). Tal associação permitirá uma retrocompatibilidade que, ainda que parcial, será altamente importante

na avaliação da tendência da prevalência de clones específicos bem como na avaliação do impacto obtido através de diferentes políticas de saúde, neste caso concreto aplicadas ao controlo e gestão programática da TB.

Além do seu funcionamento como base de dados, a CPLP-TB surge também como uma rede de colaboração que pretende integrar diversos laboratórios que atuam na vigilância epidemiológica e estudos de diversidade genética e evolução do *M. tuberculosis*. Fundamentalmente, a missão da CPLP-TB é fomentar uma nova base de trabalho colaborativa cujos principais objetivos assentam na: i) catalogação da diversidade do *M. tuberculosis* e disseminação de dados de epidemiologia molecular; ii) facilitar a comparação inter-laboratorial de dados genotípicos; iii) permitir o rastreamento de estirpes na CPLP; e, iv) promover a investigação fundamental e aplicada em estirpes clinicamente relevantes. Neste último aspeto destaca-se o facto de a CPLP-TB ter capacidade para efetivamente promover a investigação envolvendo estirpes clinicamente relevantes, por oposição a estirpes laboratoriais, uma vez que à CPLP-TB se encontra associado um biobanco de estirpes clínicas distribuído pelos seus laboratórios associados e cujos dados fenotípicos e genotípicos se encontram depositados na CPLP-TB.

Futuramente, a CPLP-TB permitirá integrar dados genómicos obtidos por sequenciação de última geração, bem como se pretende que venha a incorporar uma *pipeline* analítica para dados genómicos que assegurará uma comparação padronizada de estirpes oriundas da CPLP.

Bibliografia

- World Health Organization (2018). Global Tuberculosis Report 2018. World Health Organization, Geneva.
- European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe (2018). Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2018. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- Baganha MI (2009). The Lusophone Migratory System: Patterns and Trends. *International Migration* 47: 5-20.
- Perdigão J, Silva H, Machado D, Macedo R, Maltez F, Silva C, Jordao L, Couto I, Mallard K, Coll F, Hill-Cawthorne GA, McNERNEY R, Pain A, Clark TG, Viveiros M and Portugal I (2014). Unraveling *Mycobacterium tuberculosis* genomic diversity and evolution in Lisbon, Portugal, a highly drug resistant setting. *BMC Genomics* 15: 991.
- Portugal I, Covas MJ, Brum L, Viveiros M, Ferrinho P, Moniz-Pereira J and David H (1999). Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 3: 207-213.
- Portugal I, Maia S and Moniz-Pereira J (1999). Discrimination of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 fingerprint subclusters by rpoB gene mutation analysis. *J Clin Microbiol* 37: 3022-3024.
- Perdigão J, Clemente S, Ramos J, Masakidi P, Machado D, Silva C, Couto I, Viveiros M, Taveira N and Portugal I (2017). Genetic diversity, transmission dynamics and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Angola. *Sci Rep* 7: 42814.
- Perdigão J, Silva C, Diniz J, Pereira C, Machado D, Ramos J, Silva H, Abilleira F, Brum C, Reis AJ, Macedo M, Scaini JL, Silva AB, Esteves L, Macedo R, Maltez F, Clemente S, Coelho E, Viegas S, Rabna P, Rodrigues A, Taveira N, Jordao L, Kritski A, Lapa ESJR, Mokrousov I, Couvin D, Rastogi N, Couto I, Pain A, McNERNEY R, Clark TG, von Groll A, Dalla-Costa ER, Rossetti ML, Silva PEA, Viveiros M and Portugal I (2018). Clonal expansion across the seas as seen through CPLP-TB database: A joint effort in cataloguing *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Portuguese-speaking countries. *Infect Genet Evol* in press.
- Jaeger LH, de Souza SM, Dias OF and Iniguez AM (2013). *Mycobacterium tuberculosis* complex in remains of 18th-19th century slaves, Brazil. *Emerg Infect Dis* 19: 837-839.

Conflitos de interesses:

Os autores declaram que não existem conflitos de interesses.