XXV JORNADAS CIENTÍFICAS DE ANÁLISES CLÍNICAS E GENÉTICA HUMANA

MICOBACTÉRIAS O QUE HÁ DE NOVO EM ALGO TÃO VELHO

Anabela Santos Silva

LNR Micobactérias e TB SNRL of WHO Network

Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, Porto

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS 1835

MICOBACTÉRIAS

As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes

ORDEM – ACTINOMYCETALES
FAMÍLIA – MYCOBACTERIACEAE
GÉNERO – MYCOBACTERIUM

1997 - 50 espécies
2006 - 124 espécies e 11 subespécies
2008 - 130 espécies e 11 subespécies
2025 - > 200 espécie

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

TUBERCULOSE

XXV
JORNADAS
CIENTÍFICAS DE
ANÁLISES CLÍNICAS
E GENÉTICA HUMANA

EVIDÊNCIAS PRÉ-HISTÓRICAS E ARQUEOLÓGICAS

- **Há 500.000 anos:** Registo controverso de lesões compatíveis com tuberculose num fóssil de *Homo erectus* (Turquia)
- **Há 9.000 anos:** Casos mais sólidos de tuberculose humana foram identificados em esqueletos neolíticos
- **Europa (5.400–4.800 a.C.):** Casos mais antigos de espondilite tuberculosa na Europa foram identificados na Alemanha (Saxónia-Anhalt)
- **Egito Antigo (4500 a.C.):** Foram encontradas múmias egípcias com deformidades esqueléticas típicas da tuberculose

TUBERCULOSE

DESCOBERTA DO AGENTE ETIOLÓGICO

- **5 de dezembro de 1865** Louis Pasteur e Jean Antoine Villemain

doença contagiosa e causada por agente inoculável

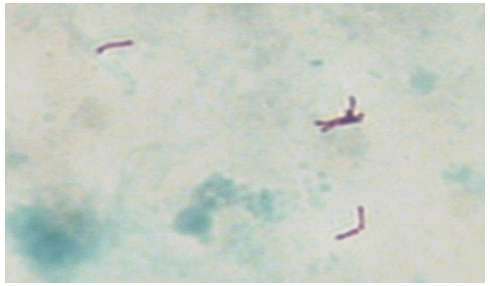
- **24 de março de 1882** Robert Koch

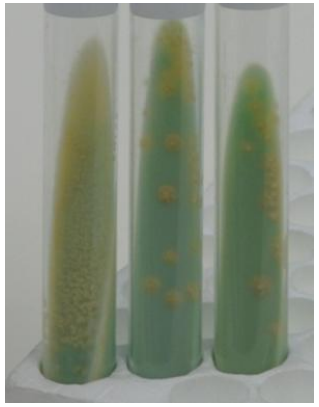
causada por uma bactéria (*Mycobacterium tuberculosis*)

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

TUBERCULOSE DOENÇA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL





- **1883,** Franz **Zhiel** desenvolve método coloração

mais tarde modificado por Friedrich **Neelsen**

- **1915,** Joseph **Kinyoun** modifica o método de coloração
- **1930s,** E. **Löwenstein** e K. **Jensen** desenvolvem meio de

cultura seletivo à base de ovo e com verde de malaquite

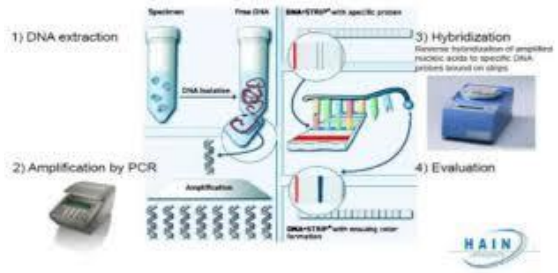
- **1950s,** primeiros antibiogramas
- **1980s,** sistemas com meios de cultura líquidos (BACTEC, MGIT,...)

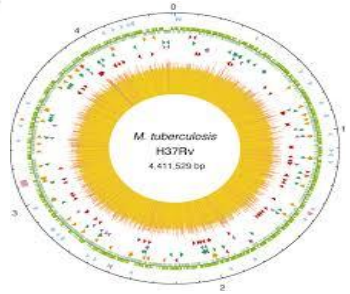
TUBERCULOSE DOENÇA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

TUBERCULOSE DOENÇA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL





- **1990s**, surgiram os primeiros testes LPA
- **1998,** 1º genoma sequenciado

- **28 abril 2008,** decisão da Comissão Europeia altera definição de caso confirmado de tuberculose

Critérios laboratoriais

— Critérios laboratoriais para confirmação do caso:

Pelo menos um dos dois critérios seguintes:

— isolamento do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (com exclusão de *Mycobacterium bovis*-BCG) numa amostra clínica,

— detecção de ácidos nucleicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* numa amostra clínica E baciloscopia positiva por microscopia óptica convencional ou fluorescente.

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

TUBERCULOSE DOENÇA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

In 2008, WHO approved the use of commercial LPAs for detecting MTBC in combination with resistance to rifampicin and isoniazid in sputum smear-positive specimens (direct testing) and in cultured isolates of MTBC (indirect testing).

Moura George

WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3:
diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update

Direcção-Geral da Saúde
www.dgs.pt
Ministério da Saúde

Direcção-Geral da Saúde — **Circular Normativa**

Assunto:	**Detecção rápida da Tuberculose Multirresistente**	**Nº: 12/DSCS/PNT** **DATA: 17/07/08**
Para:	**Todos os Serviços de Saúde**	
Contacto na DGS:	**Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose** **Drª Ana Rita Macedo** rita.macedo@dgs.pt **Dr. António Fonseca Antunes** afantunes@dgs.pt	

NORMA

No âmbito do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose e de acordo com o objectivo programático de controlo da Tuberculose Multirresistente, a Direcção-Geral da Saúde decide emitir como orientação normativa que:

1. Seja requisitado o teste de detecção molecular de multirresistência directamente na amostra clínica, sempre que se suspeite de tuberculose multirresistente;

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

TUBERCULOSE DOENÇA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

■ The Xpert MTB/RIF assay provides the foundation for a revolution in the diagnosis of TB and drug-resistant TB.

Global tuberculosis control: WHO report 2011
(WHO/HTM/TB/2011.16)

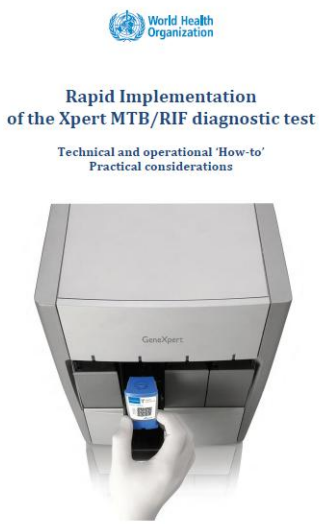


Fig. 2. WHO-recommended rapid diagnostic testing platforms to be used as initial tests for TB, 2022

WHO standard: universal access to rapid tuberculosis diagnostics. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

PRESENTE

- **Métodos moleculares** rápidos que permitem **identificação** de **MTC** e pesquisa de **mutações para isoniazida, rifampicina e fluoroquinolonas**

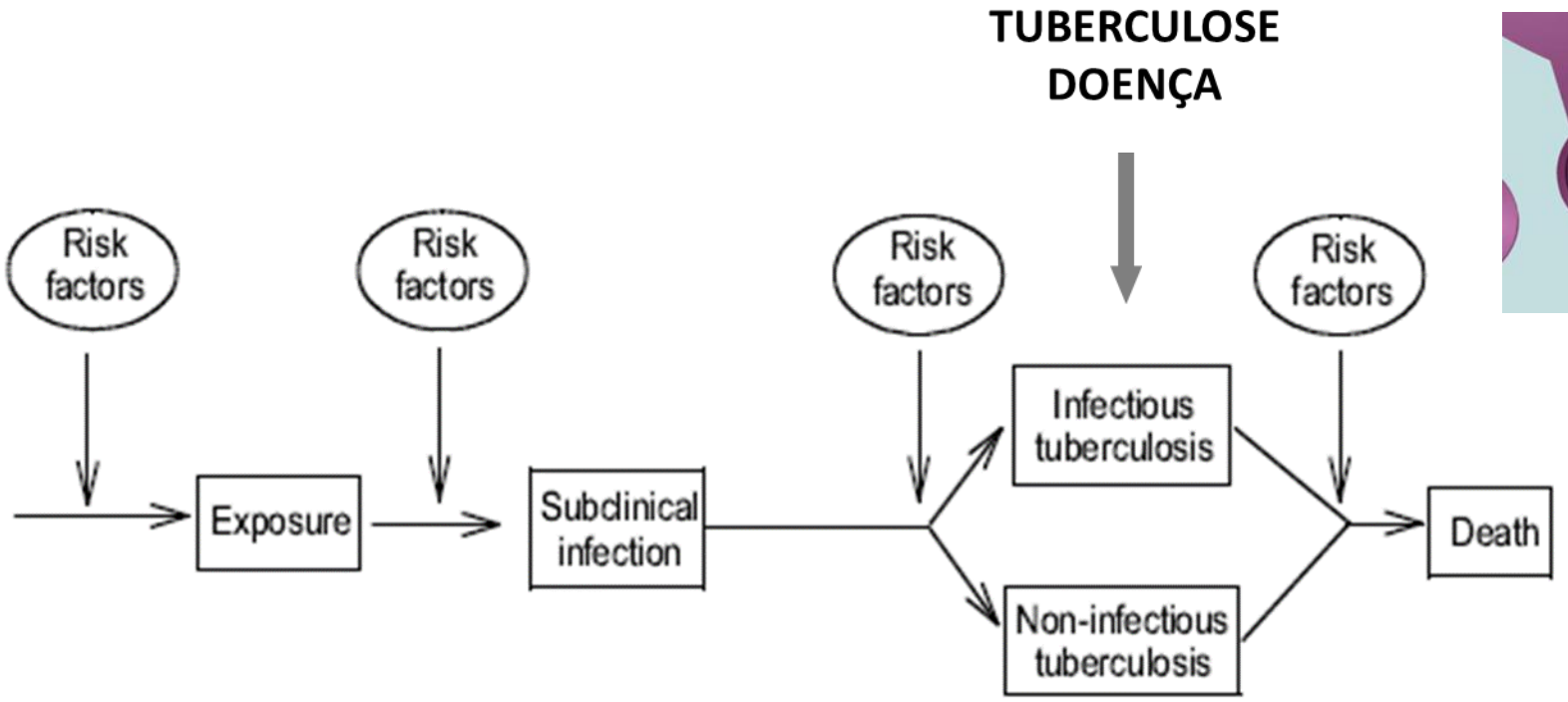
- Utilização de **análise genómica** para **previsão de resistências** e para **estudos epidemiológicos**

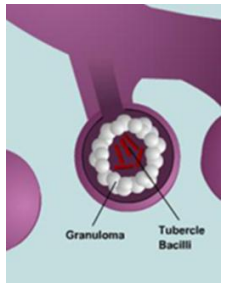
TUBERCULOSE DOENÇA

24 a 48 horas	Exame direto Deteção molecular resistências - amplificação e hibridização reversa – GenoType (ED +) - geneXpert MTB/RIF + Xpert MTB/XDR (ED -) PCR (MTC/MNT)
7 a …. dias	Exame cultural Identificação
15 a …. dias (após cultura positiva)	Testes fenotípicos de sensibilidade aos fármacos Sequenciação total genoma (TB MDR)

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

TUBERCULOSE LATENTE





• **Risco de evolução** de tuberculose **latente** para tuberculose **doença** é cerca de 10%, sendo maior nos 2 anos após infecção

Epidemiologic basis of tuberculosis control
IUATLD,1999

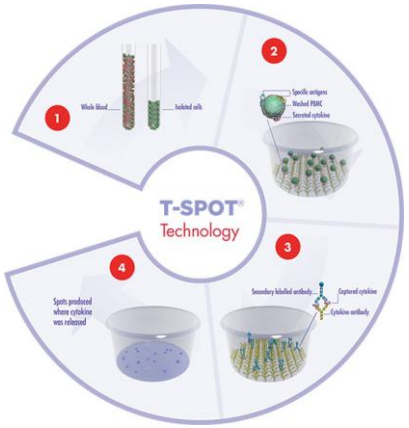
ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

TUBERCULOSE LATENTE

Comparison of the QFT-Plus and the T-Spot

Characteristics	QFT-Plus	T-Spot
Processing time	Within 16 hours (whole blood)	Within 8 to 32 hours (blood cells)
M. tuberculosis antigens	ESAT-6 and CFP-10	ESAT-6 and CFP-10
Measurement	IFN-γ concentration	Number of IFN-γ producing cells (spots)
Possible results	Positive, negative, indeterminate	Positive, negative, invalid, borderline

Comparison of the QFT-Plus and the T-Spot TB blood tests



https://www.cdc.gov/tb/hcp/testing-diagnosis/interferon-gamma-release-assay.html

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

LEPRA

XXV
JORNADAS
CIENTÍFICAS DE
ANÁLISES CLÍNICAS
E GENÉTICA HUMANA

EVIDÊNCIAS PRÉ-HISTÓRICAS E ARQUEOLÓGICAS

- Um modelo específico de transmissão propõe que uma estirpe ***M. leprae*** terá evoluído em **África** antes de **40.000 a.C.**, espalhando-se posteriormente para a Ásia e Europa.
- O caso mais antigo confirmado por análise de esqueletos foi descoberto em Balathal, na Índia, datado de 2000 a.C..
- **Europa**: Embora se pensasse que a lepra só chegou à Europa após o século IV a.C., existem evidências de um esqueleto celta do século IV-III a.C.. A doença só se tornou um **problema de saúde pública grave** na Europa durante a **Idade Média**.

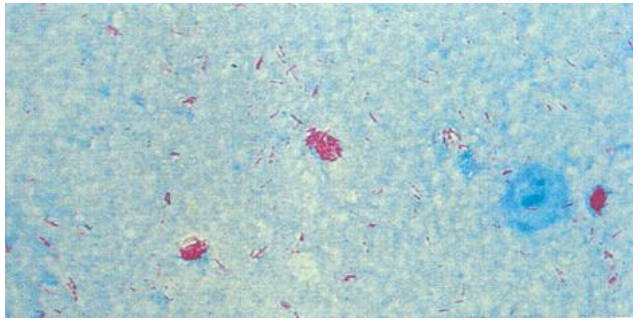
LEPRA

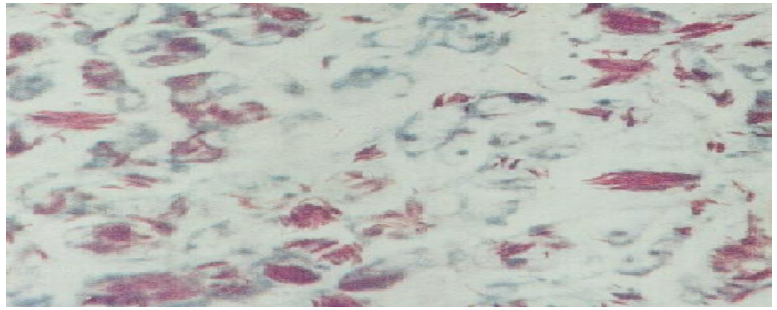
DESCOBERTA DO AGENTE ETIOLÓGICO

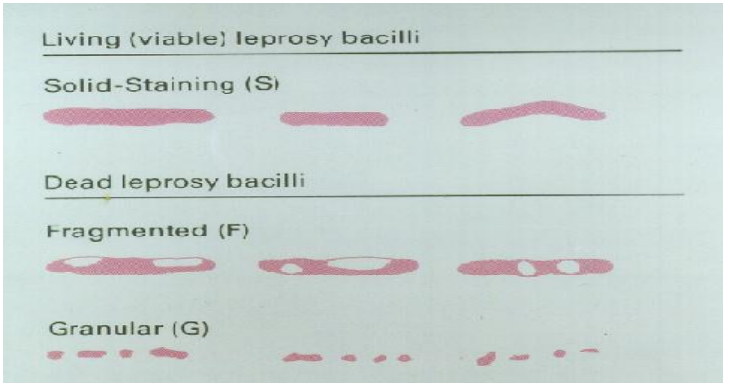
- **1873** Gerhard Hansen identificou o bacilo

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Coloração de Zhiel Neelsen modificada







ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

XXV
JORNADAS
CIENTÍFICAS DE
ANÁLISES CLÍNICAS
E GENÉTICA HUMANA

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Todas as espécies do género *Mycobacterium* à excepção do complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. ulcerans*

- **Descoberta Inicial (Final do Século XIX):** Embora as MNT tenham sido descritas pela primeira vez no final do século XIX, logo após a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*. Eram frequentemente vistas como contaminantes ambientais.
- **Reconhecimento Clínico (Final da Década de 1950):** Foi apenas no final dos anos 50 que estas bactérias começaram a ser amplamente reconhecidas como uma causa de doença em humanos.
- **Impacto na Saúde Pública (Anos 80 e 90):** As infeções por MNT ganharam enorme relevo com a epidemia de **VIH/SIDA** na década de 1980

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

- bactérias oportunistas

Doença pulmonar crónica
FQ
Bronquiectasias

Idade
Sexo feminino
Baixo índice de massa corporal
Refluxo gastro esofágico

- são ubiquitárias no meio ambiente (solo, água)

  Ambientes naturais

  Ambientes criados pelo Homem

  Piscinas
  Banheiras Hidromassagem
  Duche (aerossóis)
  Humidificadores
  Dispositivos médicos

- são intrinsecamente resistentes a vários fármacos incluindo os fármacos usados para o tratamento da tuberculose

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

- capacidade de formar e de resistir em biofilmes (chuveiros)

- resistentes ao cloro

"... *Mycobacterium avium* and related pathogens were found in slimy "biofilms" that clung inside showerheads at more than 100 times the "background" levels of municipal water."

"...bleach treatment caused a 3-fold increase in *M. gordonae*, indicating a general resistance of mycobacteria species to chlorine."

Feazel et al (2009) PNAS

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

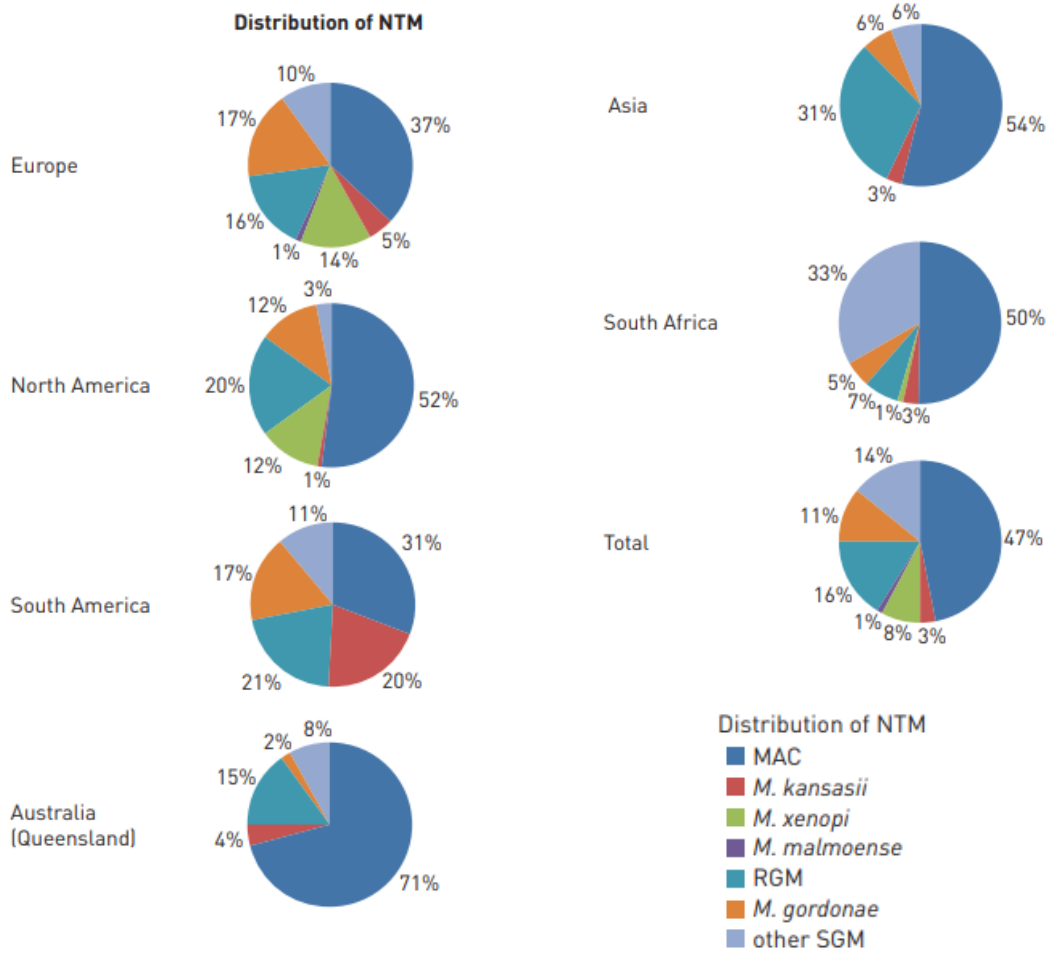


FIGURE 2 Distribution of respiratory nontuberculous mycobacteria (NTM) isolates. MAC: *Mycobacterium avium* complex; RGM: rapid-growing mycobacteria; SGM: slow-growing mycobacteria.

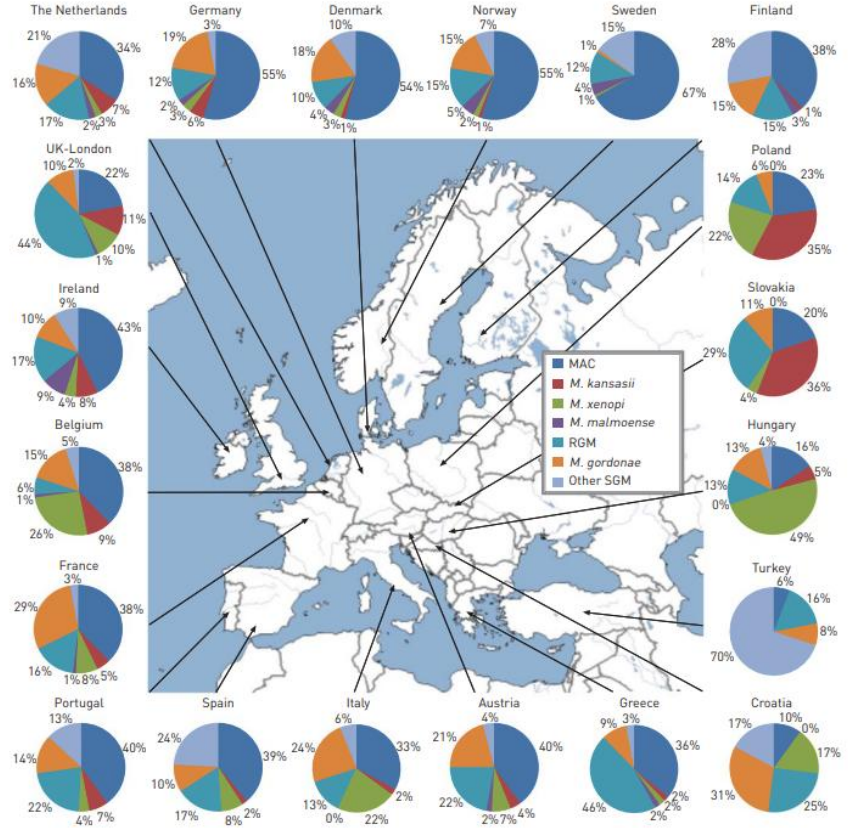


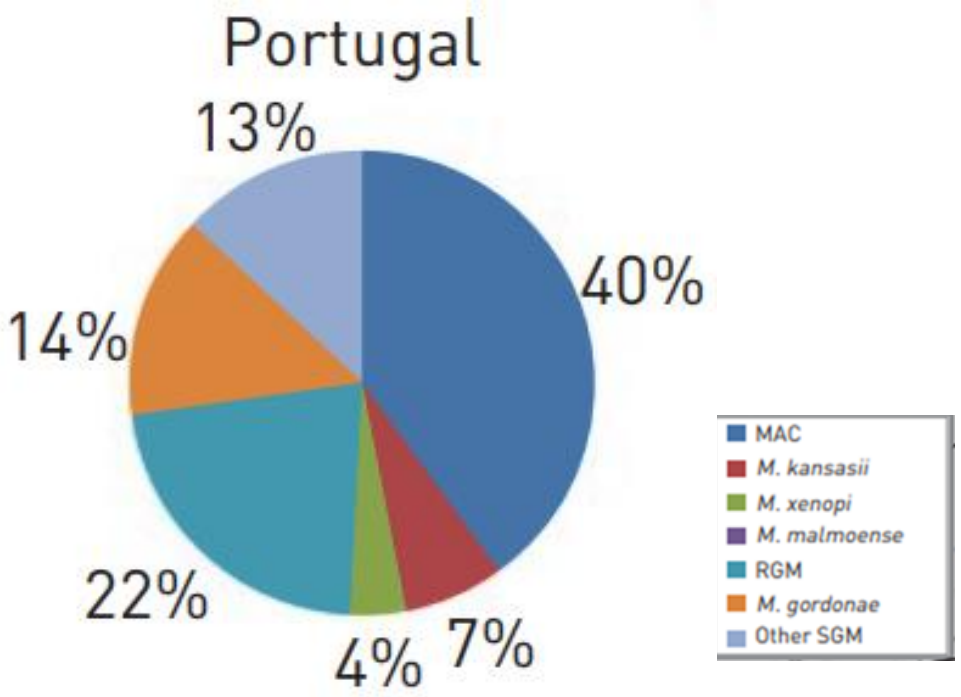
FIGURE 3 Distribution of different nontuberculous mycobacteria from pulmonary samples in 2008 in Europe. MAC: *Mycobacterium avium* complex; RGM: rapid-growing mycobacteria; SGM: slow-growing mycobacteria.

Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. Eur Respir J 2013; 42(6)

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Dados 2008



Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. Eur Respir J 2013; 42(6)

Dados 2014-2020

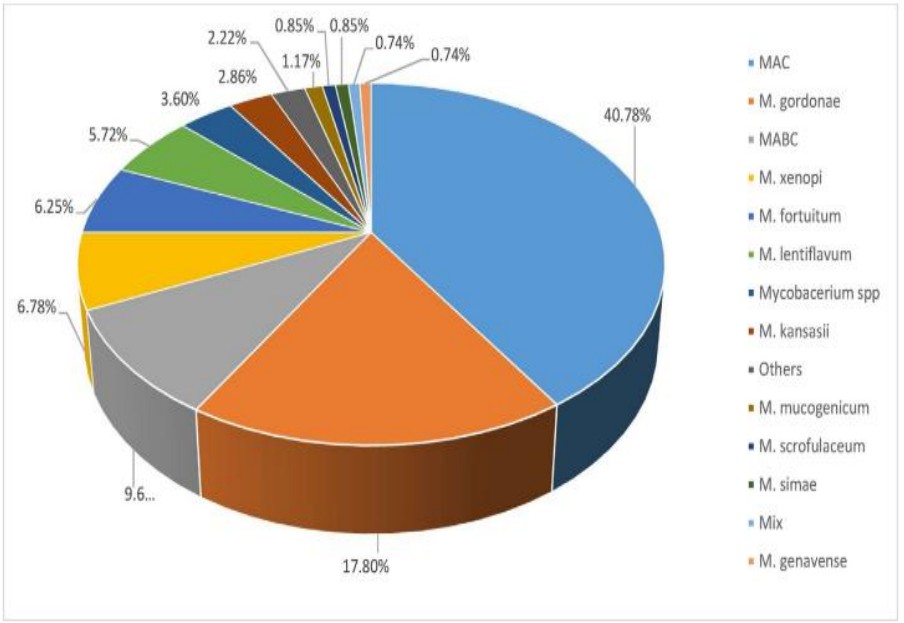


Fig. 1 Distribution of NTM species isolated from patients in Portugal from 2014-2020. *Others refer to the following species: *M. asiaticum, M. goodii, M. interjectum, M. malmoense, M. paraffinicum, M. peregrinum, M. shimoidei, M. terrae complex, M. triplex, M. triviale, and M. marinum.*

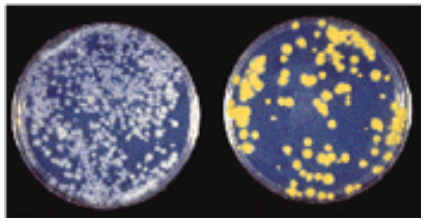
Santos A, Carneiro S, Silva A et al. Nontuberculous mycobacteria in Portugal: trends from the last decade. Pulmonology 2024; 30 (4)

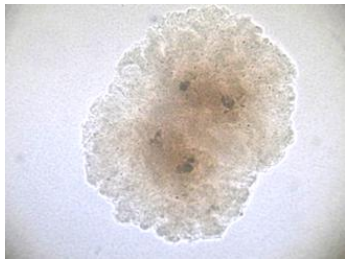
ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Mycobacterium kansasii

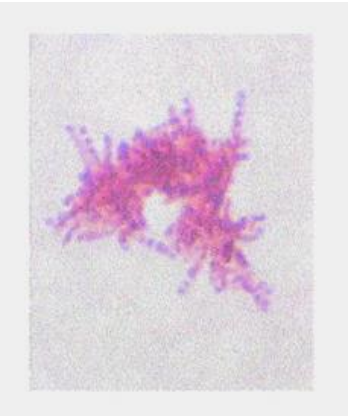
(Grupo I)





Mycobacterium gordonae

(Grupo II)

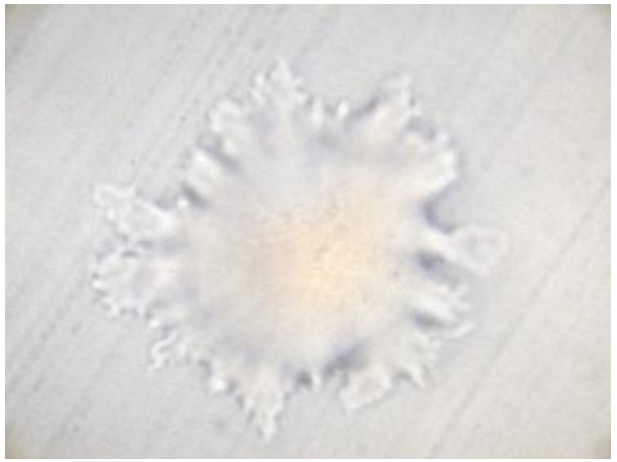


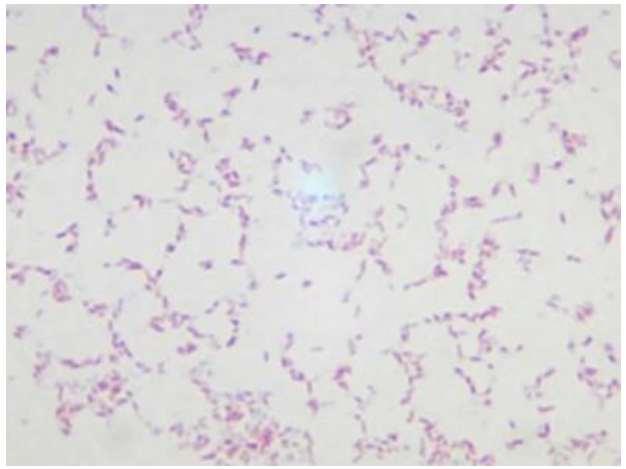
ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Mycobacterium avium **complex**

(Grupo III)



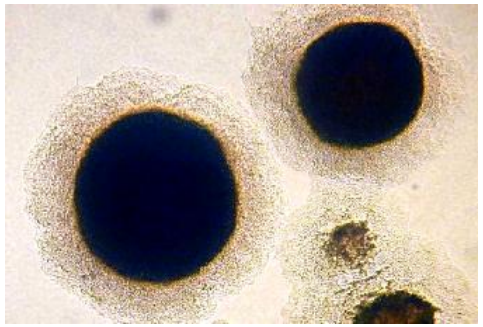


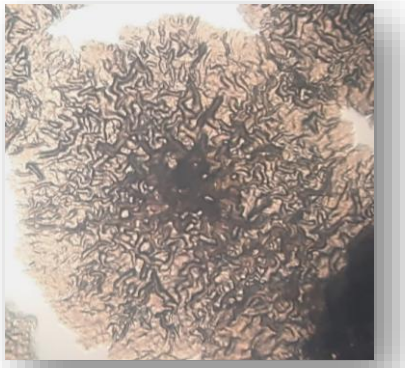
ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

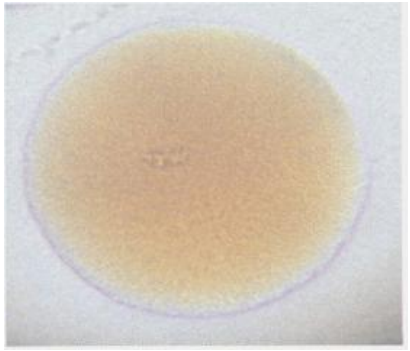
MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

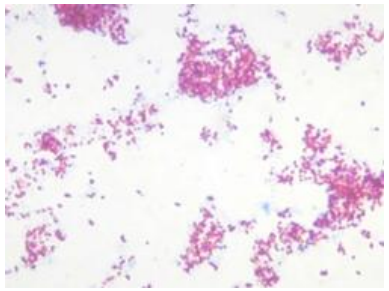
Mycobacterium abscessus complex
Mycobacterium chelonae
Mycobacterium fortuitum
Mycobacterium peregrinum

(Grupo IV ou RGM)









ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

RESUMO

XXV
JORNADAS
CIENTÍFICAS DE
ANÁLISES CLÍNICAS
E GENÉTICA HUMANA

RESUMO: O QUE TEMOS DE NOVO

TUBERCULOSE

DIAGNÓSTICO

↓

24 a 48 horas

Exame direto

Deteção molecular resistências

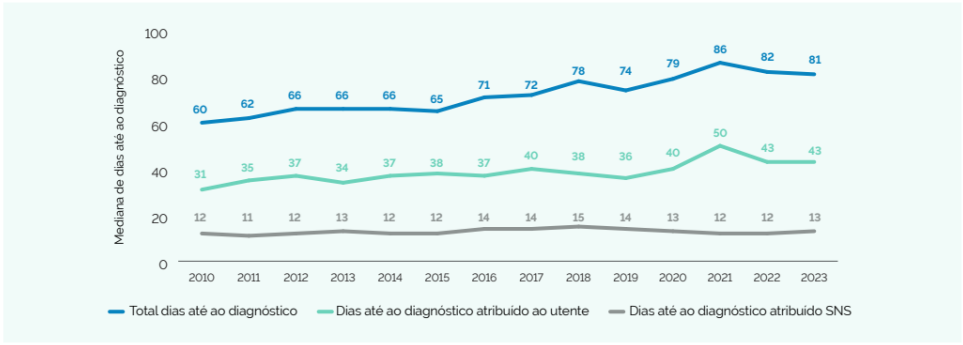
- amplificação e hibridização reversa – GenoType (ED +)
- geneXpert MTB/RIF + Xpert MTB/XDR (ED -)

PCR (MTC/MNT)

Relatório de vigilância e monitorização da tuberculose em Portugal

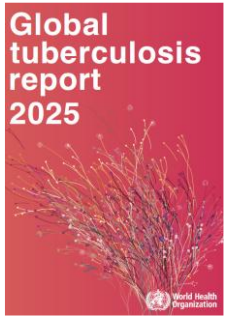
Dados 2023

Figura 9. Evolução da mediana de dias até ao diagnostico de tuberculose, 2010-2023



Fonte: SVIG-TB 2024

Tuberculosis (TB) is a preventable and usually curable disease. Nonetheless, more than 10 million people continue to fall ill with TB every year and more than 1 million die from the disease, making it the world's leading cause of death from a single infectious agent and among the top 10 causes of death worldwide.



ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

RESUMO: O QUE TEMOS DE NOVO

TUBERCULOSE

MEIOS LÍQUIDOS

↓

30 dias

Exame cultural positivo

Testes fenotípicos de sensibilidade aos fármacos

Sequenciação do genoma permite previsão de resistência (e de susceptibilidade!!!) a todos os antibacilares usados para tratamento após isolamento em cultura

FUTURO

Sequenciação do genoma diretamente da amostra

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

RESUMO: O QUE TEMOS DE NOVO

LEPRA

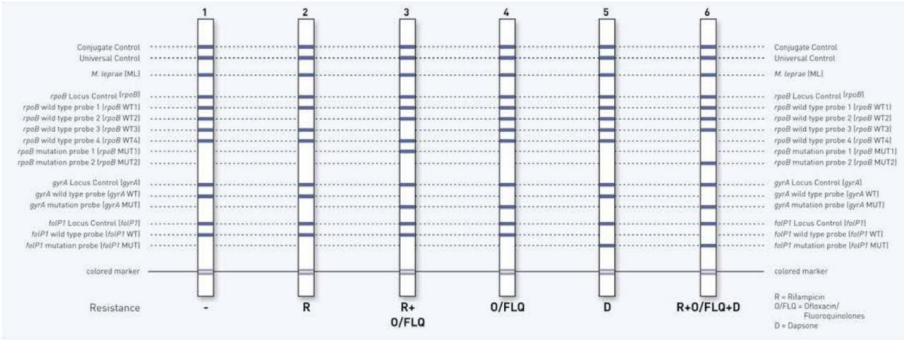
Despacho n.º 1150/2021, de 28 de janeiro

Critérios laboratoriais

Pelo menos um dos critérios seguintes:

Demonstração de bacilos ácido-álcool resistentes num esfregaço de lesão cutânea;

Demonstração de bacilos ácido-álcool resistentes numa biópsia da pele ou nervo.



Considerada erradicada em Portugal, registando-se apenas casos esporádicos importados

Indications for the Use of the GenoType LepraeDR

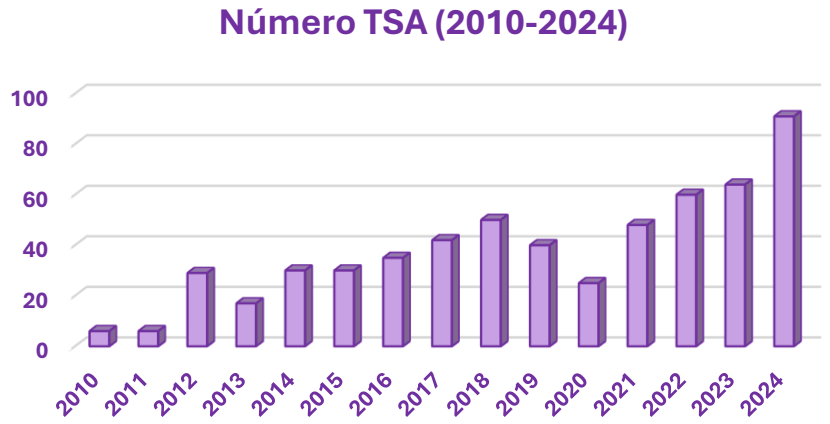
Diagnosing patients

- with suspicious anamnesis and AFB-positive biopsy
- after treatment failure and relapse
- for screening purposes to develop country-specific leprosy action plans.

RESUMO: O QUE TEMOS DE NOVO

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

- aumento da frequência do seu isolamento a partir de amostras biológicas



- número de infeções causadas por MNT tem vindo a aumentar a nível global, o que tem gerado um interesse sem precedentes na doença por MNT

- as projeções atuais sugerem que as infeções por MNT poderão triplicar até 2040

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

FUTURO DA MICOBACTERIOLOGIA

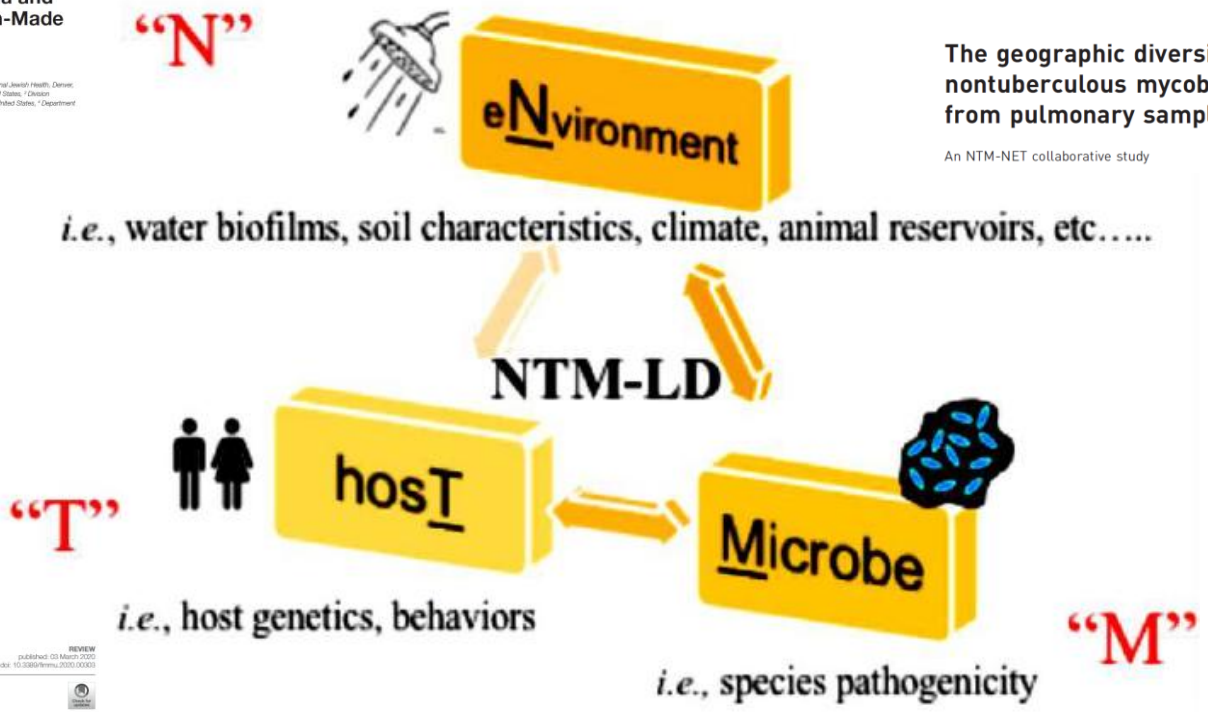
MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

frontiers in Microbiology

REVIEW

Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches

Jennifer R. Honda, Ravleen Virdi and Edward D. Chan



Honda et al, 2018. Front Microbiol.

ORIGINAL ARTICLE
RESPIRATORY INFECTIONS

The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples

An NTM-NET collaborative study

Pulmonology 000 (xxxx) 1–7

PULMONOLOGY

www.journalpulmonology.org

ORIGINAL ARTICLE

Nontuberculous Mycobacteria in Portugal: Trends from the last decade

A. Santos[a,1], S. Carneiro[a,b,1], A. Silva[c], J.P. Gomes[d], R. Macedo[a,*]

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Clinical Microbiology®

MINIREVIEW

Antimycobacterial Susceptibility Testing of Nontuberculous Mycobacteria

Barbara A. Brown-Elliott,[a] Gail L. Woods[b]*

[a]Mycobacteria/Nocardia Research Laboratory, University of Texas Health Science Center at Tyler, Tyler, Texas, USA
[b]Pathology Department, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA

frontiers in Immunology

REVIEW

The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease

Champa N. Ratnatunga, Viviana P. Lutzky, Andreas Kupz, Denise L. Doolan, David W. Reid, Matthew Field, Scott C. Bell, Rachel M. Thomson and John J. Miles

biology

Review

Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models

Saloni Saxena, Herman P. Spaink and Gabriel Forn-Cuní *

Institute of Biology Leiden, Animal Science and Health, Leiden University, Einsteinweg 55, 2333CC Leiden, The Netherlands; s.saxena@umail.leidenuniv.nl (S.S.); h.p.spaink@biology.leidenuniv.nl (H.P.S.)
* Correspondence: g.forn-cuni@biology.leidenuniv.nl

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

OBRIGADO

Anabela Santos Silva

anabela.silva@insa.min-saúde.pt

Instituto Nacional de Saúde - Porto

REPÚBLICA PORTUGUESA | SAÚDE

SNS SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE

Instituto_Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS

XXV JORNADAS CIENTÍFICAS DE ANÁLISES CLÍNICAS E GENÉTICA HUMANA