



Departamento De Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de Estudos II

Variante: Trabalho de Investigação

**Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados em adultos atendidos no Hospital Distrital da Manhica entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023**

**Autor:** Muchanga, Jorge João

Maputo, Dezembro de 2023



Departamento De Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Variante: Trabalho de Investigação

**Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados em adultos atendidos no Hospital Distrital da Manhica entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023**

**Autor:**

Muchanga, Jorge João

**Supervisores:**

Prof. Doutor José Sumbana- UEM

MSc. Edson Mambuque- CISM

Lic. Shilzia Munguambe- CISM

Maputo, Dezembro de 2023

## **Agradecimentos**

À Deus que permitiu que os meus dias se multiplicassem e eu pudesse chegar a ver o dia em que poderia realizar este trabalho.

Aos meus pais que sempre estiveram comigo dando exemplo e conselhos de superação, por nunca terem deixado de apoiar-me nas minhas decisões estudantis e profissionais, mesmo sabendo que o futuro sempre é incerto.

Aos meus supervisores que devotaram esforços e tempo para que o presente trabalho fosse realizado, pelo apoio sempre recebido. Acredito que sem sua ajuda nada poderia ter feito. Pela inspiração e encaminhamento que cada um deu, o meu muito obrigado.

Aos meus amigos que em muito ajudaram a moldar quem eu sou hoje, desde os mínimos detalhes aos grandes apoios na vida.

Ao CISM por ter permitido que este trabalho de investigação fosse realizado com recursos locais em estudos do centro, e ao pessoal do departamento de Tuberculose pelo calor e paciência que tiveram durante minha estadia no Centro.

## **Declaração de honra**

Eu, Jorge João Muchanga, declaro por minha honra que o presente trabalho intitulado “Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados em adultos atendidos no Hospital Distrital da Manhiça entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023” foi realizado por mim, como resultado da investigação desenvolvida no laboratório do Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, e que este não foi submetido para outro grau académico na Universidade Eduardo Mondlane ou noutra instituição de ensino.

O estudante

---

Jorge João Muchanga

Maputo, Dezembro de 2023

## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho aos meus pais e a todos que directa ou indirectamente actuaram e ainda actuarão à favor da minha visão estudantil e profissional.*

## Resumo

A prevalência de tuberculose em Moçambique é de 361 casos/100000 habitantes com um peso de mortalidade de 31% constituindo um problema de saúde pública. Na zona sul do País, o distrito de Manhiça apresenta altos níveis de seropositividade em adultos (39,9%) e a tuberculose é uma doença endêmica que mais causa mortes em crianças e adultos (847/100000 vivendo com HIV). A transmissão e geração de estirpes resistentes aos antibióticos usados no tratamento da tuberculose aumentam os desafios no combate à tuberculose. Entretanto, poucos estudos existem sobre o perfil de resistência aos anti-tuberculósicos, o que dificulta a orientação no tratamento e torna baixa a taxa de sucesso no tratamento da tuberculose. O presente trabalho teve como objectivo avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados em adultos atendidos no Hospital Distrital da Manhiça entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023. O estudo foi realizado incluindo 120 isolados submetidos a antibiograma pelo método de Ensaio de sonda em linha MTBDR-*plus* seguindo protocolos de processamento institucionais. De um total de 120 isolados, 11% apresentaram de resistência à pelo menos um antibiótico dos quais 10 isolados (8%) foram resistentes à isoniazida, 5 isolados (4%) foram resistentes à rifampicina e 2 isolados (2%) foram MDR-TB. Os resultados evidenciam uma necessidade de uso adequado dos antibióticos de primeira linha para o tratamento da tuberculose e testes de resistência ao *Mycobacterium tuberculosis* complex. Há necessidade de mais estudos fenotípicos e moleculares para estimar a frequência de resistência das estirpes de *M. tuberculosis* complex circulantes no país.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis* complex, Tuberculose, Susceptibilidade aos antimicrobianos, Hospital Distrital da Manhiça.

## **Lista de tabelas**

Tabela 1: Relação de concentrações críticas e proporções para o teste de sensibilidade aos antibióticos de <i>M. tuberculosis</i> complex aos antibióticos de primeira linha .....	11
Tabela 2: Lista de materiais e reagentes. ....	17
Tabela 3: Configuração do termocilador para LPA MTBDRplus ver.2.0. ....	20
Tabela 4: Comparação do perfil de susceptibilidade de isolados de <i>M. tuberculosis</i> complex pelos métodos de Ensaio de sonda em linha e Gene Xpert MTB/RIF Ultra. ....	24
Tabela 5: Cruzamento dos dados dos métodos Ensaio de sonda em Linha e Gene Xpert MTB/RIF Ultra para susceptibilidade à rifampicina. ....	24

## Lista de figuras

Figura 1: Regiões associadas à resistência no gene <i>rpoB</i> .....	14
Figura 2: Configuração de sondas de Genotype MTBDRplus ver.2.0. ....	14
Figura 3: Mapa do Distrito de Manhiça mostrando o Hospital Distrital da Manhiça.....	17
Figura 4: Distribuição dos participantes tuberculose positivos em género por faixa etária. ...	22
Figura 5: Frequência do estado serológico dos pacientes tuberculose positivos por faixas etárias. ....	22



## Lista de abreviaturas

AM-A	Solução MasterMix A
AM-B	Solução MasterMix B
CISM	Centro de Investigação em Saúde da Manhica
CON-C	Conjugado concentrado
CON-D	Diluyente do conjugado
DEN	Solução desnaturante
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
HYB	Solução de hibridização
INH	Isoniazida
LPA	Ensaio de sonda em Linha ( <i>Line probe assay</i> )
MDR-TB	Tuberculose multirresistente
MGIT	Tubo indicador de crescimento de Micobacterias
MIC	Concentração inibitória mínima
MISAU	Ministério da Saúde
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCT	Programa Nacional de Controlo da Tuberculose
RIN	Solução de lavagem ( <i>Rince</i> )
STR	Solução de lavagem ( <i>Strangent</i> )
SUB-C	Substrato concentrado
SUB-D	Diluyente do substrato
TB	Tuberculose
WT	Tipo selvagem ( <i>Wild tipe</i> )

## Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Problema de estudo .....	2
1.2. Justificativa de estudo .....	3
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Histórico da tuberculose.....	4
2.2. Situação epidemiológica da tuberculose no mundo .....	5
2.3. Situação da tuberculose em África.....	6
2.4. Situação de tuberculose em Moçambique .....	6
2.5. Características microbiológicas do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex .....	7
2.6. Mecanismos de virulência de <i>M. tuberculosis</i> complex .....	7
2.6.1. Factores proteicos para virulência do <i>M. tuberculosis</i> complex.....	8
2.6.2. Factores não proteicos para virulência do <i>M. tuberculosis</i> complex.....	8
2.7. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos de <i>M. tuberculosis</i> complex .....	9
2.7.1. Mecanismos de resistência à rifampicina .....	9
2.7.2. Mecanismos de resistência à estreptomicina .....	10
2.7.3. Mecanismos de resistência à isoniazida.....	10
2.7.4. Mecanismos de resistência à pirazinamida (PZA).....	10
2.7.5. Mecanismos de resistência ao etambutol.....	11
2.8. Métodos análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>M. tuberculosis</i> complex.....	11

2.8.1.	Método de proporções.....	11
2.8.2.	Método de concentrações absolutas.....	12
2.8.3.	Método de razão de resistência.....	12
2.8.4.	Método de gradiente antimicrobiano ( <i>Etest</i> ).....	12
2.8.5.	Métodos moleculares.....	12
3.	Objectivos.....	15
3.2.	Específicos.....	15
4.	Hipóteses.....	15
5.	Metodologia.....	16
5.1.	Área de estudo.....	16
5.2.	Materiais e Métodos.....	17
5.3.	Tipo de estudo.....	17
5.4.	Considerações éticas.....	18
5.5.	População e Amostragem.....	18
5.5.1.	Colheita de amostras.....	18
5.5.2.	Critérios de inclusão e exclusão.....	18
5.5.3.	Variáveis.....	19
5.6.	Parte experimental.....	19
5.6.1.	Ensaio de sonda em linha (LPA).....	19
5.6.2.	Amplificação.....	19
5.6.3.	Hibridização.....	20

5.7. Análise de dados.....	21
6. Resultados.....	22
6.1. Características demográficas e clínicas da população de estudo .....	22
6.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de <i>M. tuberculosis</i> complex através dos métodos de PCR por Xpert Ultra e Ensaio de sonda em linha.....	23
6.3. Comparação dos testes de susceptibilidade de isolados de <i>M. tuberculosis</i> complex: Xpert Ultra e Ensaio de sonda em linha (LPA).....	24
7. Discussão de Resultados.....	26
7.1. Características demográficas e clínicas da população.....	26
7.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de <i>M. tuberculosis</i> complex através dos métodos de PCR por Xpert Ultra e Ensaio de sonda em linha (LPA).....	27
7.3. Comparação dos testes de susceptibilidade de isolados de <i>M. tuberculosis</i> complex pelos métodos Xpert MTB/RIF Ultra e Ensaio de sonda em linha.....	30
8. Conclusões.....	32
9. Limitações .....	33
10. Recomendações .....	34
11. Referências bibliográficas .....	35
Anexos .....	40

## 1. Introdução

A tuberculose é uma doença respiratória infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), tendo sido declarada uma emergência sanitária internacional pela OMS em 1993 (Abraham *et al.*, 2020). Actualmente a tuberculose é considerada a segunda maior causa de mortes por doenças infecciosas (Gómez *et al.*, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de um terço da população mundial é portadora da bactéria em seu corpo (Gómez *et al.*, 2018), sendo o desenvolvimento da doença, em países de baixa e média renda, relacionado ao aumento de casos de HIV positivo (Costa *et al.*, 2018; García-Basteiro *et al.*, 2016) e à pobreza extrema (Adikaram *et al.*, 2012).

Em 2019 foram reportados mais de 10 milhões de casos tuberculose positivos em todo mundo, dos quais 1.4 milhões morreram devido à esta doença (Yigzaw *et al.*, 2021) e destes acima de 90% foram reportados em África, com maior incidência na África Austral (Teferi *et al.*, 2021), tendo 26% dos pacientes resultado em morte (PNCT,2023).

Em Moçambique, tal como em outros países da região subsaariana, a situação da tuberculose é devastadora (Garcia-Basteiro *et al.*, 2019) sendo estimada uma média de 361 cidadãos que desenvolvem a doença em cada 100 mil habitantes (PNCT, 2023). Estima-se que em 2022, o país teve aproximadamente 110 mil novos casos de tuberculose dos quais aproximadamente 49 % morreram pela doença (PNCT, 2023).

O Programa Nacional de Controlo da Tuberculose (PNCT), lançado em 1977 com o objectivo de controlar a problemática da tuberculose no país, iniciou o sistema de registro de pacientes e introduziu a terapia de tratamento da tuberculose (Nguenha *et al.*, 2018).

Actualmente, o tratamento da Tuberculose em Moçambique é feito usando medicamentos de primeira linha rifampicina, isoniazida (Zaw *et al.*, 2018), pirazinamida, etambutol e estreptomicina (PNCT, 2021; Perdigão, 2008) em uma terapia de um mínimo de seis meses (Feliciano *et al.*, 2018). A emergência e disseminação de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes aos medicamentos de primeira linha mostra a necessidade de contínua vigilância para melhor orientação no tratamento clínico de pacientes com tuberculose (OMS, 2021 e Feliciano *et al.*, 2018).

As estirpes de *M. tuberculosis* resistentes têm sido associadas ao longo período de tratamento ou incumprimento e abandono do tratamento por parte dos pacientes (Valencia *et al.*, 2018).

Em Moçambique, apesar da alta prevalência da tuberculose (361 em cada 100 mil habitantes), poucos estudos sobre a frequência e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de primeira linha usados contra a infecção por *M. tuberculosis* foram feitos e, devido a este factor o tratamento clínico principalmente nas zonas rurais é feito empiricamente (Valencia, 2017; PNCT, 2023).

Os estudos actuais sobre a frequência de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes realizados em Moçambique mostram que nos últimos anos houve tendência de aumento dos casos de resistência em Moçambique, variando de 912 casos em 2016 chegando a 1441 em 2023 (Nguenha, 2018; PNCT, 2023). Porém, em 2022 o PNCT registou um aumento dos casos de tuberculose multirresistente (MDR) na ordem de 8% (PNCT, 2023).

O presente trabalho teve como objectivo avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados em adultos atendidos no Hospital Distrital da Manhica entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023.

### **1.1. Problema de estudo**

Em Moçambique, assim como noutros países, a tuberculose constitui um problema de saúde pública tendo sido registrados 110674 casos em 2022 dos quais 1441 foram multirresistentes e aproximadamente 12% destes casos foram declarados óbitos (PNCT, 2023). Porém, poucos estudos existem sobre o perfil de resistência aos anti-tuberculósicos, o que dificulta a orientação no tratamento e torna baixa taxa de sucesso no tratamento em Moçambique (Nguenha, 2018).

O aumento da circulação de estirpes *M. tuberculosis* multiresistentes nas comunidades pode gerar o aumento do peso da tuberculose no sistema de saúde e aumento de casos de insucesso no tratamento que podem levar ao aumento de óbitos por tuberculose (Gómez-Tangarife, 2018), havendo por isso necessidade de contínua vigilância (Eddabra e Neffa, 2020).

Estudos comparativos realizados em Manhica mostraram que os níveis de resistência de estirpes de *M. tuberculosis* têm aumentado anualmente tendo sido registrados 14,4% de casos de resistência num total de 312 amostras analisadas em 2018 (Mariner-Llicer, 2023). A partir

desse conhecimento, surge a seguinte questão: Qual é o perfil de susceptibilidade em isolados de *M. tuberculosis* em adultos TB positivos no distrito de Manhíça actualmente?

## **1.2. Justificativa de estudo**

A realização de estudos de prevalência e identificação das estirpes de *M. tuberculosis* circulantes marca um avanço na luta contra endemia da tuberculose em Moçambique. O conhecimento do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *M. tuberculosis* em indivíduos adultos pode ajudar na orientação terapêutica e controlo da tuberculose (Yu, 2014).

Apesar dos avanços no combate da tuberculose como uma doença endémica em Moçambique, o país continua com grande número de infecções e um nível baixo nível (48%) de sucessos no tratamento da doença quando comparados aos níveis de desistências e mortes pela doença (PNCT, 2021).

O Distrito de Manhíça é um dos pontos na província de Maputo com maior índice de positividade para o HIV chegando aos 39,9% em adultos, e a taxa de coinfeção TB/HIV tem vindo a crescer tendo sido estimada em 2011 que 847/100 000 adultos e 470/100 000 crianças menores de 3 anos portadores do vírus HIV desenvolveram a tuberculose (Valencia *et al.*, 2017).

Apesar dos esforços empreendidos no controlo da tuberculose à nível do distrito, estudos locais realizados nos hospitais do distrito revelam um crescimento na frequência de estirpes resistentes aos antibióticos de primeira linha tendo saído dos 11,2% em 2008 para os 14,4% em 2018 (Valencia *et al.*, 2017) e ainda assim, poucos estudos são realizados para determinar a frequência de circulação das estirpes resistentes no distrito de Manhíça.

Assim, num contexto pós-pandemia COVID-19, alta taxa de coinfeção TB/HIV, aumento dos casos de resistência aos antibioticos e baixa eficácia no tratamento da tuberculose resistente no país, há uma necessidade de desenvolvimento de estudos que têm como objectivo determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes de *M. tuberculosis complex* para a orientação de tratamento e controlo de infecções no país.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Histórico da tuberculose

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo da espécie *Mycobacterium tuberculosis* (Abraham *et al.*, 2020). A sua forma mais comum é pulmonar, mas podendo infectar outros órgãos do corpo como os ossos, sistema nervoso central, entre outras formas (Kant *et al.*, 2021 e Massabni e Bonini, 2019).

A tuberculose é uma doença que sempre acompanhou a humanidade em várias partes do mundo, mas só passou a ser conhecida por este nome nos finais do século dezanove, sendo antes conhecida como *phthisis* na antiga Grécia (Medcalf *et al.*, 2013 e Frith, 2014).

As evidências da infecção pela tuberculose podem ser vistas há séculos atrás (Prabhu e Singh, 2019) e apontam a existência de um ancestral do *Mycobacterium tuberculosis* complex que esteve presente na África do Este há mais de 3 milhões de anos. Dados genéticos indicam que os membros modernos do complexo (*Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, entre outros) são originados de um único ancestral africano (Daniel, 2006).

Em 1679, Sylvius de la Boe fez a primeira descrição anatômica e patológica da doença, descrevendo a aparição de “tubérculos” pulmonares como uma característica da manifestação da tuberculose pulmonar (Prabhu e Singh, 2019 e Frith, 2014).

Em 1882, Robert Koch desenvolveu a técnica de visualização de *Mycobacterium* através da coloração de esfregaços (Medcalf *et al.*, 2013; Prabhu e Singh, 2019) feitos a partir do escarro ou gotículas de espirro de pacientes (Prabhu e Singh, 2019) e conseguiu isolar e replicar a infecção em animais (Barberis *et al.*, 2017).

A descoberta do meio para diagnóstico Lowenstein-Jensen (LJ) marcou outro importante avanço no diagnóstico da tuberculose a partir de cultura bacteriana em meio enriquecido (Prabhu e Singh, 2019).

Em 1949, foi introduzido a estreptomicina como o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose. Contudo, a sua acção foi limitada devido a ocorrência de mutações cromossômicas nos genes do *M. tuberculosis* que induziam à resistência. Isso levou a



introdução de novos antibióticos e uma nova terapia de com uso de mistura de antibióticos no período de tratamento (Barberis *et al.*, 2017 e Prabhu e Singh, 2019).

Em 1993, a OMS classificou a tuberculose como epidemia que já havia afectado mais de um terço da população mundial, estando 13 dos 15 países com maior incidência localizados em África (Prabhu e Singh, 2019 e Medcalf *et al.*, 2013).

Com o surgimento das técnicas de biologia molecular, a busca por novas técnicas de diagnóstico e entendimento dos mecanismos de funcionamento deste bacilo estão a ser estudadas de modo a fortalecer a vigilância sanitária mundialmente (Prabhu e Singh, 2019).

## **2.2. Situação epidemiológica da tuberculose no mundo**

Segundo estimativas da OMS, a tuberculose encontra-se no grupo das 10 doenças mais mortais mundialmente (Jang e Chung, 2020). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da tuberculose, estando maior parte destes casos concentrada nos países em desenvolvimento (OMS, 2020).

Em Moçambique, a OMS estima que ocorrem anualmente 163000 casos de tuberculose, mas somente cerca de 8800 casos são notificados e cerca de 30% desses são perdidos devido à falta de seguimento (PNCT, 2019).

A estratégia do Programa Nacional de Controlo da Tuberculose inclui o diagnóstico e testagem massiva de indivíduos presuntivos e vulneráveis para TB e seus contactos, e gestão de casos positivos usando antibióticos de primeira linha (PNCT, 2020a).

Actualmente, a situação epidemiológica da tuberculose é agravada devido ao surgimento de estirpes de MTB multi-resistentes aos medicamentos (MDR) e à eclosão do vírus da imunodeficiência Humana (HIV) (PNCT, 2019; Singh *et al.*, 2020). A OMS inclui Moçambique na lista de países com número de casos de estirpes MDR em ascensão. Ainda assim, o país apresenta baixos níveis de detecção de Tuberculose MDR (Nguenha *et al.*, 2018).

A tuberculose Multi-resistente (MDR-TB) é definida como tuberculose resistente aos antibióticos de primeira linha, incluindo Isoniazida (INH) e Rifampicina (RIF) (Jung e Chung, 2020; Valencia, 2017; Jung e Chung, 2020).

### **2.3. Situação da tuberculose em África**

A tuberculose é uma doença epidémica em quase todo mundo. Entretanto, o caso é agravante para o continente africano e com maior enfoque para a região subsaariana (Kaufmann e Parida, 2008). A OMS estimou em 2019 que cerca de 10 milhões de pessoas foram infectadas pela tuberculose e que 25% dos casos mundiais de sejam foram em África e 32% terminaram em morte (OMS 2020a).

A situação agrava-se devido a alta prevalência do HIV/SIDA em África que contribui com 86 % dos casos de coinfeção da tuberculose mundialmente de quase meio milhão de indivíduos portadores do vírus HIV (OMS, 2020a). Os programas de controlo da tuberculose em África apresentam baixas taxas de detecção da tuberculose o que agrava o caso de infecções e aumenta a carga da doença (OMS, 2020b).

Ainda assim, esforços sanitários têm levado à diminuição da taxa anual de infecção na ordem dos 3,6% e seguindo o plano de erradicação da tuberculose desenhado pela OMS até 2030 (OMS, 2020b).

A resistência aos medicamentos é outro problema que se levanta em África. Em 2019, foram reportados mundialmente meio milhão de doentes com resistência à rifampicina dos quais 78% apresentava multirresistência aos antibióticos usados contra a tuberculose (Kaufmann e Parida, 2008; OMS, 2020a).

### **2.4. Situação de tuberculose em Moçambique**

Dados da OMS indicam que mundialmente os casos de resistência chegaram em 2017 a uma média de 3.5% entre novos diagnosticados e 18% entre em indivíduos tuberculose positivos previamente tratados (OMS, 2018).

Em Moçambique, assim como noutros países, a tuberculose constitui um problema de saúde pública tendo sido registrados 97.093 casos em 2020 dos quais 1364 foram multirresistentes e aproximadamente 12% destes casos foram declarados óbitos (PNCT, 2021). Porém, poucos estudos existem sobre o perfil de resistência aos anti-tuberculósicos, o que dificulta a orientação no tratamento e torna baixa taxa de sucesso no tratamento em Moçambique (Nguenha, 2018).

Apesar dos avanços no combate da tuberculose como uma doença endêmica em Moçambique, o país continua com grande número de infecções e um baixo nível de sucessos no tratamento da doença (48%) quando comparados aos níveis de desistências e mortes pela doença (PNCT, 2021).

Estudos comparativos realizados em Manhíça mostraram que os níveis de resistência de estirpes de *M. tuberculosis* têm aumentado anualmente, tendo sido registrados 15% de casos de resistência num total de 228 amostras analisadas em 2015 (Valencia, 2017).

No Distrito da Manhíça, a tuberculose é uma das principais doenças endêmicas e constitui um problema sanitário, sendo a principal causa de morte em indivíduos com coinfeção com HIV (Ngunha *et al.*, 2017).

## **2.5. Características microbiológicas do *Mycobacterium tuberculosis* complex**

*M. tuberculosis* é uma bactéria com formato bacilar pertencente ao género *Mycobacterium* que engloba bacilos aeróbicos imóveis, produtores de ácido micólico, não formadores de esporos com até 10 µm de tamanho, com alto conteúdo lipídico na sua parede celular (Katalinić-Janković *et al.*, 2012).

A sua parede celular é rica em lípidos, o que confere à camada hidrofóbica a capacidade de resistência à vários desinfetantes e antibióticos comuns, característica determinante para o uso da coloração Ziehl - Nielsen e alvo dos antibióticos, respectivamente (Katalinić-Janković *et al.*, 2012 e Delogu *et al.*, 2013).

O *M. tuberculosis* é uma bactéria intracelular com genoma com aproximadamente 4 Mbp e é englobado no grupo de bactérias fastidiosas, pois possui baixa crescimento em meios de cultura, levando de 12 a 24 horas para divisão celular e um mínimo de 8 semanas para deteção de cultura sólida positiva. Possui capacidade de em crescimento formar estruturas serpentina chamadas fator-corda, característico do complexo (Katalinić-Janković *et al.*, 2012).

## **2.6. Mecanismos de virulência de *M. tuberculosis* complex**

A virulência do *M. tuberculosis* complex está ligada as moléculas responsáveis pela transmissão, infecção e sobrevivência, capacidade de evasão a resposta imune do hospedeiro

e a capacidade de causar dano pulmonar no hospedeiro (Echeveria-Valencia *et al.*, 2018) e estas podem ser divididas segundo a natureza como factores proteicos e não proteicos (Ramon-Luing, 2023).

### **2.6.1. Factores proteicos para virulência do *M. tuberculosis* complex**

Estruturas como os sistemas proteicos de secreção são o principal mecanismo de virulência do *M. tuberculosis* complex (Delogu *et al.*, 2013; Ramon-Luing *et al.*, 2023). Cinco sistemas de secreção foram identificados no *M. tuberculosis* complex: ESX-1, ESX-2, ESX-3, ESX-4 e ESX-5 (Delogu *et al.*, 2013; Ramon-Luing *et al.*, 2023).

O sistema ESX-1 é essencial para virulência completa do *Mycobacterium* e é responsável pela secreção de proteínas para migração do fagossomo para o citosol do macrófago infectado, e assim garantir sua sobrevivência. O sistema ESX-3 está envolvida na aquisição de íons de ferro e zinco envolvidos no crescimento e multiplicação do *Mycobacterium* no hospedeiro (Delogu *et al.*, 2013; Ramon-Luing *et al.*, 2023).

O sistema ESX-5 é o Sistema envolvido na secreção de produtos envolvidos na evasão ao sistema imune atuando na interação da bactéria com o sistema imune do hospedeiro (Delogu *et al.*, 2013; Ramon-Luing *et al.*, 2023).

Embora as funções dos sistemas ESX2 e ESX4 não tenham sido totalmente descritas até hoje, a descoberta dos sistemas ESX marcaram um avanço significativo no conhecimento da virulência e patogênese do *M. tuberculosis* complex.

### **2.6.2. Factores não proteicos para virulência do *M. tuberculosis* complex**

Entre vários factores que contribuem para a virulência do *M. tuberculosis* complex, o perfil lipídico presente na parede celular é uma das mais importantes características para completa virulência e sobrevivência do *Mycobacterium* na célula hospedeira (Campelo *et al.*, 2021).

O *M. tuberculosis* possui uma camada lipídica dinâmica que é envolvida no transporte dos antibióticos para o interior da célula do bacilo. Essa estrutura permite que o *M. tuberculosis* altere a composição da sua camada lipídica em resposta às condições impostas pelo hospedeiro, podendo aumentar a virulência. O perfil lipídico da parede celular do

*Mycobacterium* tem também a capacidade de gerar e modular a resposta imune do hospedeiro (Campelo *et al.*, 2021).

Outros componentes não proteicos ligados à virulência do *M. tuberculosis* complex são os glicolípidos, glicanos, ácidos nucleicos e metabólitos que são componentes vitais na superfície bacteriana e responsáveis pela interação entre a bactéria e a célula hospedeira, reconhecimento, sobrevivência intracelular para virulência (Delogu *et al.*, 2013; Ramon-Luing *et al.*, 2023).

## **2.7. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos de *M. tuberculosis* complex**

O surgimento de resistências nas estirpes do género *Mycobacterium* sp. deve-se ao surgimento de mutações espontâneas no genoma bacteriano que conferem mecanismos específicos de resistência aos antibióticos (Jung e Chung, 2020, Johnson *et al.*, 2009 e Abraham *et al.*, 2020).

A resistência aos medicamentos de primeira linha tem sido ligada à mutações pontuais nos genes *katG*, *ahpC*, *inhA*, *kasA*, and *ndh* para resistência à INH (sendo *katG* e *inhA* os mais comuns), gene *rpoB* para resistência à RIF, *pncA* para resistência à PZA, *embB* para resistência à EMB e and *rpsL* and *rrs* para resistência à STR (Singh *et al.*, 2020 e Johnson *et al.*, 2009).

A resistência do MTB ocorre geralmente a um antibiótico, pois os loci que sofrem mutação e conferem resistência não se encontram ligados (Muthaiah *et al.*, 2017).

### **2.7.1. Mecanismos de resistência à rifampicina**

As mutações pontuais (adições, deleções e substituições) no gene *rpoB* são tidas como responsáveis pela geração de resistências à rifampicina, sendo 95% dessas mutações localizadas na região de 81bp, tida como região determinante para a resistência à rifampicina (Gómez-Tangarife, 2018, Abraham *et al.*, 2020, Muthaiah *et al.*, 2017 Johnson *et al.*, 2009). Essas alterações causam menor afinidade entre a rifampicina e a unidade  $\beta$  do RNA mensageiro, permitindo transcrição do mRNA bacteriano (Abraham *et al.*, 2020 e Johnson *et al.*, 2009).

### **2.7.2. Mecanismos de resistência à estreptomicina**

A resistência à estreptomicina está associada a mutações nos genes *rpsL*, *rrs* e *gid* que vão ditar os níveis de resistência ao antibiótico na bactéria. Actua ligando-se à quatro aminoácidos da proteína 12S da subunidade 30S do ribossoma (*rrs*) (Maron, 2017) e ao rRNA 16S (*rpsL*) que levam a paragem na leitura do RNA mensageiro, causando mudanças na sequência de aminoácidos na síntese de proteínas bacteriana resultando em proteínas não funcionais ou tóxicas (Singh *et al.*, 2020, Maron, 2017 e Johnson *et al.*, 2009).

A resistência à estreptomicina ocorre por mutações pontuais que ocorrem em genes que codificam as proteínas alvo *rpsL* resultando na substituição de aminoácido e *rrs* resultando na alteração do gene em duas regiões distintas (Maron, 2017).

### **2.7.3. Mecanismos de resistência à isoniazida**

Os dois genes associados a resistência à isoniazida são:

*katG* – codifica a proteína catalase-peroxidase. A perda ou diminuição da actividade da catalase-peroxidase pode resultar na resistência à INH. Mutações como deleções e substituições no gene *katG* podem levar à diminuição da actividade da enzima catalase . Maior parte destas mutações ocorrem entre os codões 138 e 328 (Muthaiah *et al.*, 2017 e Johnson *et al.*, 2009).

*inhA*- que codifica a proteína carregadora enoil-acil-redutase. A isoniazida activada liga-se ao complexo *inhA*-NADH e inibe a biossíntese do ácido mycólico pela formação de estrutura terciária (Muthaiah *et al.*, 2017).

As mutações pontuais e substituições que ocorrem na região promotora do gene *inhA* resultam na diminuição da afinidade da isoniazida ao complexo *inhA*-NADH aumentando o nível de resistência (Muthaiah *et al.*, 2017 e Johnson *et al.*, 2009).

### **2.7.4. Mecanismos de resistência à pirazinamida (PZA)**

As mutações em diversos nucleotídeos do gene *pncA* são apontadas como causadoras de resistência à pirazinamida causando diminuição na produção da enzima pirazinamidase (Singh *et al.*,2020 e Johnson *et al.*, 2009) codificada pelo gene *pncA* que converte a

pirazinamida em ácido pirazinóico que diminui o pH no citoplasma bacteriano levando à ruptura da membrana plasmática (Singh *et al.*,2020).

### 2.7.5. Mecanismos de resistência ao etambutol

As mutações no gene *embB*, que codifica a enzima arabinosil-transferase, causam o desenvolvimento de resistência ao etambutol. Mutações no códon 306 do gene *embB* são as mais apontadas por causarem resistência ao antibiótico (Abraham *et al.*, 2020 e Singh *et al.*, 2020) com substituições de A por G, A por C, G por A, e G por C que causam mudanças nos aminoácidos produzidos (Singh *et al.*, 2020). Por outro lado, polimorfismos nas unidades *embA*, *mbC* e mutações nos codões 497 e 406 são indicados como precursores de resistência em 30% dos casos de resistência à etambutol confirmada (Abraham *et al.*, 2020).

## 2.8.Métodos análise do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *M. tuberculosis complex*

Os vários métodos de avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos são usados para avaliar a susceptibilidade do *Mycobacterium tuberculosis complex*, mas os mais usados são o método das proporções, o método de concentrações absolutas e os métodos moleculares.

### 2.8.1. Método de proporções

O método de proporções detecta a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M. tuberculosis complex* em meios com concentrações inibitórias para o bacilo, inibindo o crescimento das estirpes resistentes. As concentrações críticas usadas para cada antibiótico e a proporção de bacilos resistentes no meio de cultura são tabelados e as amostras de *M. tuberculosis complex* são consideradas resistentes quando a proporção de crescimento é maior que a proporção estabelecida para cada fármaco (Agertt, 2012).

Tabela 1: Relação de concentrações críticas e proporções para o teste de sensibilidade aos antibióticos de *M. tuberculosis complex* aos antibióticos de primeira linha

Antibiótico	Concentração crítica (µg/mL)	Proporção (%)
Rifampicina	40,0	1,0
Isoniazida	0,2	1,0

Pirazinamida	100,00	10,0
Etambutol	2,0	1,0

### **2.8.2. Método de concentrações absolutas**

O método de concentrações absolutas baseia-se na comparação do número de colônias em dois meios de cultura, um contendo antibiótico e outro controle. Os resultados deste método são afectados pela quantidade do inóculo e pela precisão na concentração de cada droga (Alcaide *et al.*, 2017).

### **2.8.3. Método de razão de resistência**

Este método compara as concentrações mínimas inibitórias dos bacilos testados à concentração mínima inibitória de uma estirpe conhecida tida como referência (Alcaide *et al.*, 2017) controlando os valores de concentração inibitória mínima (MIC) para um determinado isolado. A razão de resistência é calculada dividindo os valores de MIC do isolado testado pelo MIC de uma estirpe padrão susceptível (Drobniewski *et al.*, 2007).

### **2.8.4. Método de gradiente antimicrobiano (*Etest*)**

O método de gradiente antimicrobiano é um método quantitativo que se baseia no gradiente de difusão antimicrobiana em um meio de cultura sólido. Neste método uma fita contendo com gradiente de concentrações de antibióticos é colocada em meio de cultura contendo os bacilos à serem testados de modo a obter-se o MIC dos antituberculosos (Balouiri *et al.*, 2016 e Alcaide *et al.*, 2017).

### **2.8.5. Métodos moleculares**

Os métodos moleculares para detecção do MTBC detectam a presença de ácidos nucleicos do *Mycobacterium tuberculosis* complex em amostras de expectoração e detectam a presença de genes mutados que conferem resistência aos antibióticos usados contra a tuberculose (Aricha *et al.*, 2019).

Os métodos de teste por amplificação de ácidos nucleicos como Xpert Ultra e LPA são os mais usados e indicados pela OMS e pelo PNCT, pois possuem a capacidade de detecção de Mutações associadas a resistência à rifampicina (Aricha *et al.*, 2019) que é um dos



antituberculosos de primeira linha (Nathavitharana *et al*, 2017). O método LPA possui também capacidade de detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida nos genes *katG* e *inhA* (Aricha *et al.*, 2019).

#### **2.8.5.1. Xpert Ultra**

O método de amplificação de ácidos nucleicos baseado em cartuchos é actualmente recomendado pela OMS como teste rápido de diagnóstico para tuberculose. O Xpert Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) é um ensaio molecular *in vitro*, automatizado e integrado que detecta e qualifica quanto à presença de material genético do *M. tuberculosis* complex e a resistência à Rifampicina (Cepheid, 2020 e Dorman *et al*, 2018).

O teste Xpert Ultra tem como princípio a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real que detecta e qualifica o *M. tuberculosis* complex quanto a resistência. Este possui iniciadores que se ligam e amplificam a sequência de 81 pb do gene *rpoB* (onde se encontram maior parte das mutações que conferem resistência) que vão se ligar a sondas selvagens ou mutagênicas (Cepheid, 2020 e WHO, 2016).

#### **2.8.5.2. Ensaio de sonda em linha (LPA)**

Os ensaios de sonda em linha são testes de diagnóstico molecular rápido de sondas em linha que detectam a presença do *Mycobacterium tuberculosis* complex e suas respectivas susceptibilidades em amostras positivas (Brandão, 2018).

O teste possui a capacidade de detecção de Mutações associadas a resistência à rifampicina no centro do gene *rpoB* com 81bp (demostrado na fig. 1) onde são detectadas 95% das mutações RIF resistentes e Mutações associadas a resistência à isoniazida na região promotora do gene *inhA* e no codão 315 do gene *katG* onde são detectadas 90% das mutações INH resistentes (Nathavitharana *et al*, 2017 e Brandão, 2018).

Resistance regions and common resistance-mediating mutations

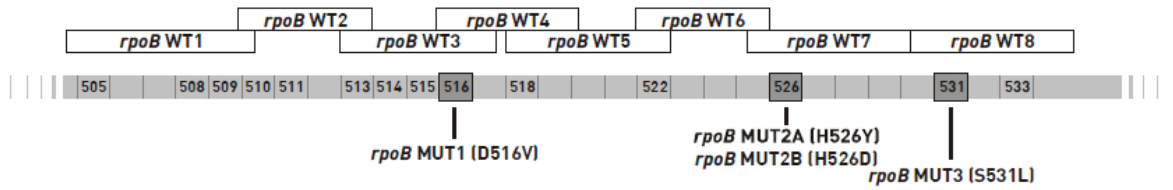


Figura 1: Regiões associadas à resistência no gene *rpoB*. *rpoB* WT1-8: sondas selvagens; *rpoB* MUT1-3: sondas de mutação.

Fonte: Hain Lifescience, 2015

O kit MTBDRplus ver.2.0 possui sondas (fig.3) para as regiões selvagens do gene *rpoB* entre os codões 505 a 533.

Line	
1	Conjugate Control
2	Amplification Control
3	<i>M. tuberculosis</i> complex TUB
4	<i>rpoB</i> Locus Control <i>rpoB</i>
5	<i>rpoB</i> wild type probe 1 <i>rpoB</i> WT1
6	<i>rpoB</i> wild type probe 2 <i>rpoB</i> WT2
7	<i>rpoB</i> wild type probe 3 <i>rpoB</i> WT3
8	<i>rpoB</i> wild type probe 4 <i>rpoB</i> WT4
9	<i>rpoB</i> wild type probe 5 <i>rpoB</i> WT5
10	<i>rpoB</i> wild type probe 6 <i>rpoB</i> WT6
11	<i>rpoB</i> wild type probe 7 <i>rpoB</i> WT7
12	<i>rpoB</i> wild type probe 8 <i>rpoB</i> WT8
13	<i>rpoB</i> mutation probe 1 <i>rpoB</i> MUT1
14	<i>rpoB</i> mutation probe 2A <i>rpoB</i> MUT2A
15	<i>rpoB</i> mutation probe 2B <i>rpoB</i> MUT2B
16	<i>rpoB</i> mutation probe 3 <i>rpoB</i> MUT3
17	<i>katG</i> Locus Control <i>katG</i>
18	<i>katG</i> wild type probe <i>katG</i> WT
19	<i>katG</i> mutation probe 1 <i>katG</i> MUT1
20	<i>katG</i> mutation probe 2 <i>katG</i> MUT2
21	<i>inhA</i> Locus Control <i>inhA</i>
22	<i>inhA</i> wild type probe 1 <i>inhA</i> WT1
23	<i>inhA</i> wild type probe 2 <i>inhA</i> WT2
24	<i>inhA</i> mutation probe 1 <i>inhA</i> MUT1
25	<i>inhA</i> mutation probe 2 <i>inhA</i> MUT2
26	<i>inhA</i> mutation probe 3A <i>inhA</i> MUT3A
27	<i>inhA</i> mutation probe 3B <i>inhA</i> MUT3B
	Colored marker

Figura 2: Configuração de sondas de Genotype MTBDRplus ver.2.0.

Fonte: Hain Lifescience, 2015

A existência de limitações no teste LPA, como o facto deste não cobrir todas as regiões susceptíveis a mutações e que podem conferir resistência, faz que o teste LPA não detecte estirpes com mutações resistentes fora das regiões com sondas (Hain Lifescience, 2015).

### 3. Objectivos

#### 3.1. Geral

- Avaliar Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados em adultos atendidos no Hospital Distrital da Manhiça entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023.

#### 3.2. Específicos

- ❖ Descrever as características demográficas e clínicas dos pacientes tuberculose positivos;
- ❖ Determinar o perfil de susceptibilidade de isolados de *M. tuberculosis* complex à isoniazida e rifampicina através dos métodos de PCR por Xpert Ultra e do ensaio de sonda em linha;
- ❖ Comparar os resultados do perfil de susceptibilidade à rifampicina de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* complex obtidos pelos métodos PCR por Xpert Ultra com os do Ensaio de sonda em linha.

### 4. Hipóteses

- **Hipótese nula:** As estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados de pacientes tuberculose positivos no distrito da Manhiça não são resistentes a isoniazida e rifampicina.
- **Hipótese alternativa:** As estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* complex isolados de pacientes tuberculose positivos no distrito da Manhiça são resistentes a isoniazida e rifampicina.

## **5. Metodologia**

### **5.1.Área de estudo**

O estudo foi realizado no Hospital Distrital da Manhiça (HDM), localizado na província de Maputo. O HDM é um hospital de referência no distrito e atende a maior parte da população de Manhiça, chegando, com outros centros de Saúde da região, a atender a uma população de aproximadamente 110 mil pacientes (Valencia, 2017).

Dividido em seis postos distritais, o Distrito de Manhiça possui um Hospital Distrital que atende aproximadamente 110000 habitantes e um hospital rural em Xinavane (INE, 2012), e estes são responsáveis pelo atendimento dos casos de Tuberculose no distrito (Valencia, 2017).

Inaugurado em 1997, o HDM possui a capacidade de 110 camas de internamento (Valencia, 2017) e desde o início de seu funcionamento, o HDM tem cooperado com o Centro de Investigação em Manhiça (CISM) na vigilância da prevalência e morbidade de doenças infecciosas no distrito (O'Callaghan-Gordo, 2011).

O distrito da Manhiça possui uma prevalência de HIV entre indivíduos dos 18-47 anos de aproximadamente 39,9% e, a prevalência estimada de tuberculose nestes é de 847 indivíduos em cada 100 mil habitantes (Saavedra, 2021).

As amostras para a realização do presente estudo foram colhidas no Hospital Distrital da Manhiça. O processamento das amostras foi realizado no laboratório de Micobacteriologia do Centro de Investigação em Saúde da Manhiça (CISM).

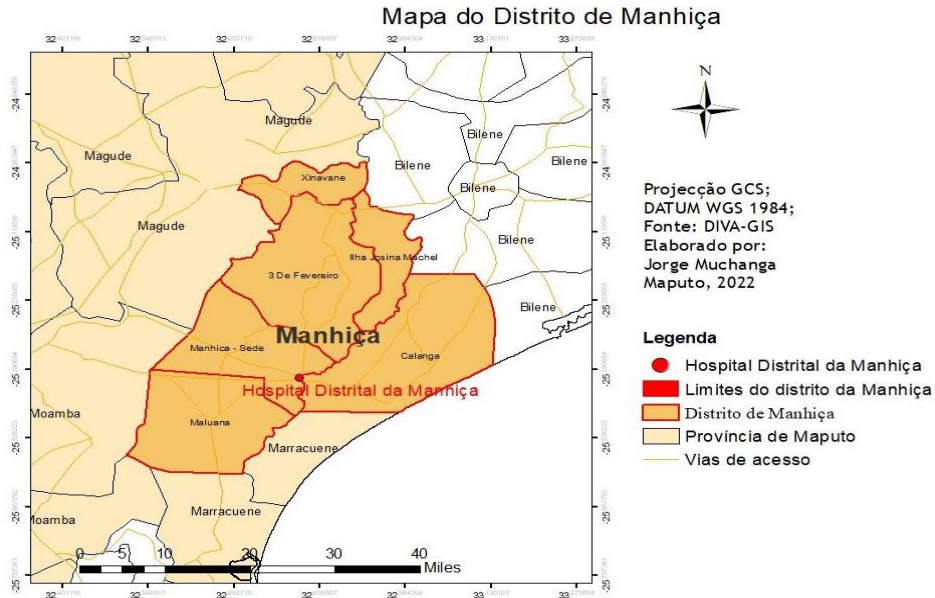


Figura 3: Mapa do Distrito de Manhica mostrando o Hospital Distrital da Manhica.

Fonte: Autor.

## 5.2. Materiais e Métodos

Tabela 2: Lista de materiais e reagentes.

<b>Materiais</b>	<b>Reagentes</b>
Papel absorvente	Solução de Hipoclorito de sódio 10%
Canetas Marcadoras	Álcool etílico 70%
Micropipetas (p1000, p200, p20)	Kit Genolyse
Pipetas de Pasteur (5 mL)	Kit Genotype MTBDRplus 2.0
Pontas (1000µL, 200µL e 5-	EPI
Vórtex	MGIT
Aparelho Twincubator	Ágar Sangue
Termociclador	TB ID test

## 5.3. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo analítico transversal, conduzido no Hospital Distrital da Manhica, onde foram testados isolados de *M. tuberculosis* complex de culturas líquidas positivas de indivíduos no Distrito de Manhica.

#### **5.4.Considerações éticas**

O presente trabalho está enquadrado nos estudos 2G Color Plates, Stool NIH e Stool for TB correndo no Centro de Investigação em Saúde da Manhica, com códigos de aprovação 423/CNBS/20, 738/CNBS/20 e 598/CNBS/21, respectivamente, do Comitê Nacional de Bioética em Saúde.

Os princípios éticos, tais como existência de consentimento informado, privacidade e confidencialidade foram cumpridos durante a pesquisa e nenhum dado pessoal dos participantes foi publicado em nenhum momento da pesquisa.

O estudo incluiu indivíduos elegíveis que já tinham participado dos projectos acima citados e que tenham assinado um termo de consentimento informado.

#### **5.5.População e Amostragem**

A população de estudo incluiu pacientes adultos atendidos no Hospital Distrital da Manhica com confirmação laboratorial de tuberculose pelo Xpert Ultra.

##### **5.5.1. Colheita de amostras**

Os pacientes foram instruídos para colheita de amostras de expectoração em frascos escarradores devidamente rotulados e todas as amostras foram processadas no laboratório de nível III do Centro de Investigação em Saúde da Manhica.

##### **5.5.2. Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos no estudo indivíduos residentes no distrito da Manhica, com confirmação positiva ao diagnóstico por Xpert Ultra que tenham assinado um termo de consentimento informado.

Foram excluídos deste estudo indivíduos menores de 18 anos de idade, que não têm residência formal no Distrito de Manhica e indivíduos que não aceitaram assinar o consentimento informado e participar de estudos a decorrer no CISM.

### 5.5.3. Variáveis

Foram consideradas variáveis dependentes: Teste *Ensaio de sonda em linha* positivo e susceptibilidade aos antibióticos de primeira linha (isoniazida e rifampicina); e variáveis independentes: histórico de tratamento da tuberculose, sexo, idade, estado serológico;

## 5.6. Parte experimental

### 5.6.1. Ensaio de sonda em linha (LPA)

O *Ensaio de sonda em linha* foi realizado usando os kits de extração (GenoLyse®) e o kit Genotype® MTBDRplus ver.2.0 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) para PCR e hibridização em isolados obtidos a partir de cultura líquida MGIT.

#### 5.6.1.1. Extração do Ácido desoxirribonucleico de *M. tuberculosis* complex

1. Em uma cabine de biossegurança adicionou-se a um tubo Eppendorf 1.5 mL o volume de 1.00 mL de amostra de cultura líquida e centrifugou-se a 10000 xG por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante.
2. Em seguida, o Pellet foi ressuscitado em 100 µL de mistura de lise (100 µL de tampão de lise – A-LYS- e 2 µL de controlo interno), misturou-se em vórtex por 5 segundos e foi deixado incubar em banho-maria à 95 °C por 5 minutos. Após incubação foram retidas as amostras do banho-maria e adicionados aos tubos 100 µL de tampão de neutralização (A-NB) e voltou-se a centrifugar a mistura por 5 minutos a 15000 xG.

### 5.6.2. Amplificação

- i. Em cabine de biossegurança, foram misturados os reagentes AM-A (10 µL) e AM-B (35 µL) da Kit *Genotype Kit* (quantidade para cada 5 µL de amostra) e colocados em tubos Eppendorf de 0.2 mL.
- ii. Foram adicionados aos tubos contendo a Master Mix 5 µL de ADN extraído e foram levados os tubos contendo a mistura ao termociclador para corrida PCR.

A programação do termociclador será feita segundo as seguintes definições:

Tabela 3: Configuração do termocilador para LPA MTBDRplus ver.2.0.

Etapas da PCR	Condições		Número de ciclos
	Tempo	Temperatura	
Activação	15 minutos	95 °C	1 ciclo
Desnaturação	30 segundos	95 °C	10 ciclos
Anelamento	2 minutos	65 °C	
Elongação	25 segundos	95 °C	30 ciclos
	40 segundos	50 °C	
	40 segundos	70 °C	
Elongação final	8 minutos	70 °C	1 ciclo

### 5.6.3. Hibridização

- i. Em uma placa de hibridização, foram colocados 20 µL da solução DEN em cada poço e em seguida 20 µL de amostra extraída (amplicons) e deixou-se descansar por 5 minutos à temperatura ambiente.
- ii. Foi adicionado, em seguida, 1000 µL da solução de hibridização (HYB) e colocados em cada poço uma fita (contida no kit) e levou-se a placa para incubar no aparelho TwinCubator® à temperatura de 45 °C por 30 minutos.
- iii. Com Micropipeta, foi retirada a solução HYB dos poços (uma ponta para cada poço) e adicionado a cada poço 1000 µL da solução de lavagem STR e deixada incubar no aparelho por 15 minutos.
- iv. Do mesmo modo foi retirada a solução STR dos poços e foram realizadas duas lavagens consecutivas RIN adicionando a cada poço 1000 µL da solução e deixando incubar por 5 minutos à 25 °C e descartando, em seguida, subitamente a solução.
- v. Foram adicionados 1000 µL da solução do conjugado (previamente preparada pela dissolução do concentrado do conjugado - CON-C - em diluente do conjugado – CON-D - na proporção 1:10) aos poços e deixado incubar por 30 minutos no aparelho.



- vi. Efectuou-se, em seguida, uma lavagem com 1000 µL da solução RIN e uma lavagem com 1000 µL água destilada em cada poço.
- vii. Adicionou-se 1000 µL da solução do substrato (previamente preparada pela dissolução de SUB-C em SUB-D - na proporção 1:10) e incubou-se por 15 minutos no aparelho.
- viii. Em seguida foi descartada a solução do substrato e procedeu-se a duas lavagens consecutivas com água destilada. As fitas foram retiradas dos poços e foram interpretados os resultados.

### **5.7. Análise de dados**

Os dados de pacientes, nomeadamente sexo, idade, estado serológico para o HIV, histórico de tratamento de tuberculose e código da amostra foram registados e analisados com recurso ao Sistema Stata/SE versão 14.0 (Stata Corporation, College station, Estados Unidos).

As variáveis dependentes (Resultado Xpert Ultra, cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis* complex e LPA positivo ou negativo dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis*) foram organizados e avaliados no Sistema Stata para cálculo de frequências e médias e construção de gráficos.

Os dados de susceptibilidade foram analisados usando o Sistema Stata/SE versão 14.0 (Stata Corporation, College station, Estados Unidos) com significância estatística  $p < 0.05$  e intervalo de confiança de 95%.

## 6. Resultados

### 6.1. Características demográficas e clínicas da população de estudo

No presente estudo foram analisadas 120 amostras de pacientes tuberculose positivos colhidas no Hospital Distrital da Manhica entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023. Dos 120 pacientes positivos para tuberculose, 72 (60,0%) foram indivíduos do género masculino e 48 (40,0%) do género feminino. A idade média dos participantes foi de 41,2 anos (18-87 anos; CI: 38,6-43,9) com um desvio padrão de 14,2.

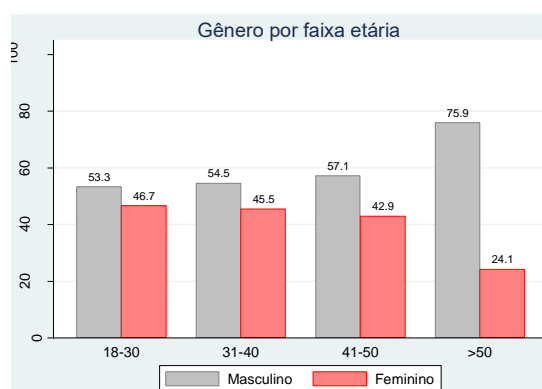


Figura 4: Distribuição dos participantes tuberculose positivos em género por faixa etária.

O estado serológico de HIV foi obtido para apenas 119 indivíduos e um paciente teve estado serológico desconhecido, dos quais 58 pacientes (48,3%) foram HIV<sup>+</sup>, 61 pacientes (50,8%) foram HIV<sup>-</sup> (Gráfico 1). A maioria dos participantes HIV<sup>+</sup> pertence a faixa etária dos 41-50 e 31-40 anos de idade com uma taxa de seropositividade de 60,7% e 60,6%, e a minoria pertence a faixa de 18-30 anos com 30,0%.

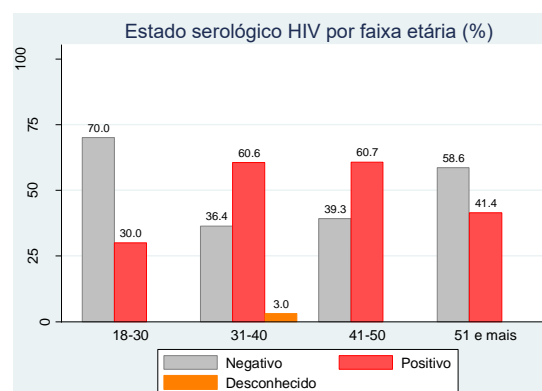


Figura 5: Frequência do estado serológico dos pacientes tuberculose positivos por faixas etárias.

Dos 120 participantes tuberculose positivos todos apresentaram tuberculose pulmonar. Destes, somente 3 (2,5%) foram de indivíduos previamente tratados para a tuberculose pulmonar e os restantes 117 (97,5%) participantes foram novos casos de tuberculose pulmonar.

## **6.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *M. tuberculosis* complex através dos métodos de PCR por Xpert Ultra e Ensaio de sonda em linha**

### **6.2.1. Xpert Ultra**

Dos 120 isolados testados pelo Xpert Ultra, 115 (95,83%) foram determinados sensíveis, 3 (2,50%) apresentaram mutações associadas à resistência e 2 (1,67%) foram indeterminados para susceptibilidade à rifampicina.

Dos 117 pacientes com novos casos de tuberculose, 3 (2,50%) apresentaram mutações associadas à resistência aos antibióticos e nenhum paciente com histórico de tratamento para tuberculose apresentou resistência aos medicamentos pelo método Xpert Ultra.

### **6.2.2. Ensaio de Sonda em Linha (LPA)**

Dos 120 isolados testados pelo ensaio de sonda em linha, 107 (89,17%) foram susceptíveis, 13 (10,83%) apresentaram mutações associadas a resistência à pelo menos um antibiótico e 2 isolados (1,66%) apresentaram mutação associada à resistência aos dois antibióticos. 5 isolados (4,16%) apresentaram mutações de resistência à Rifampicina e 10 (8,33%) a Isoniazida.

Pelo método de Ensaio de sonda em linha, dos 117 pacientes com novos casos de tuberculose, 13 (11,11%) apresentaram mutação de resistência à pelo menos um antibiótico e nenhum paciente com previamente tratado para tuberculose apresentou mutação associada a resistência aos medicamentos.

### 6.3.Comparação dos testes de susceptibilidade de isolados de *M. tuberculosis* complex: Xpert Ultra e Ensaio de sonda em linha (LPA)

Do total de 120 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* complex que foram avaliados quanto ao perfil de susceptibilidade usando os métodos Ensaio de sonda em linha e Gene Xpert MTB/RIF Ultra, observou-se o seguinte: 112 (93,33%) foram sensíveis aos dois métodos 2 (1,66%) dos isolados foram determinados resistentes para os dois métodos e 6 (5,00%) apresentaram resultados discordantes (Tabela 6).

Dos 6 isolados com resultados discordantes, 4 isolados (3,33%) tiveram resultados discordantes quanto à susceptibilidade à rifampicina: 1 (0,83%) resistente somente pelo Gene Xpert MTB/RIF e 3 (2,50%) foram resistentes somente pelo *Ensaio de sonda em linha*. Os restantes 2 isolados (1,7%) com resultados discordantes tiveram resultado indeterminado para o Xpert Ultra enquanto pelo ensaio de sonda em linha nenhum isolado apresentou perfil genotípico indeterminado (Tabela 6).

Tabela 4: Comparação do perfil de susceptibilidade de isolados de *M. tuberculosis* complex pelos métodos de Ensaio de sonda em linha e Gene Xpert MTB/RIF Ultra.

Susceptibilidade à RIF <i>n=120</i>	Perfil de susceptibilidade			Total
	Sensível	Resistente	Indeterminado	
Ensaio de sonda em linha	115 (95,83%)	5 (4,17%)	0	120 (100%)
Gene Xpert Ultra	115 (95,83%)	3 (2,50%)	2 (1,67%)	120 (100%)

Tabela 5: Cruzamento dos dados dos métodos Ensaio de sonda em Linha e Gene Xpert MTB/RIF Ultra para susceptibilidade à rifampicina.

<i>n=120</i> Ensaio de sonda em linha	Xpert Ultra			Total
	Sensível	Resistente	Indeterminado	
Sensível	112 (93,33%)	1 (0,83%)	2 (1,67%)	115 (95,83%)
Resistente	3 (2,5%)	2 (1,67%)	0	5 (4,17%)
<b>Total</b>	115 (95,8%)	3 (2,5%)	2 (1,67%)	120 (100,00%)

Foram registados 2 isolados resistentes simultaneamente à rifampicina e a isoniazida e os restantes foram monorresistências maioritariamente à isoniazida, indetectáveis ao Xpert Ultra.

## 7. Discussão de Resultados

### 7.1. Características demográficas e clínicas da população

O presente estudo teve como objectivo avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de primeira linha de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* complex aos antimicrobianos de primeira linha em adultos atendidos pelo Centro de Investigação de Manhica entre Janeiro de 2022 e Junho de 2023, tendo sido incluídos 120 isolados de *M. tuberculose*.

Os participantes tuberculose positivos foram na maior parte indivíduos do género masculino e menor parte do sexo feminino com 60% e 40% de frequência, respectivamente. Tais dados aproximam-se aos dados reportados pelo Programa Nacional de Controlo da Tuberculose que reportou no ano de 2022 uma maior incidência da tuberculose em indivíduos do sexo masculino com uma contribuição de 52% (PNCT, 2023). Os factores apontados para menor notificação da tuberculose em indivíduos do sexo feminino são a diferença fisiológica nas mulheres na baixa resposta a tuberculina, que leva a apresentar sintomas mais genéricos da tuberculose fazendo que estas visitem hospitais não especializados na detecção da tuberculose, e factores de risco comportamentais como o fumo, diferenças dietárias, ocupação e maior exposição em ambientes de transmissão nos indivíduos do género masculino (Hof *et al.*, 2010).

A idade media reportada foi de 41 anos de idade e a faixa 30-40 anos de idade apresentou maior número de indivíduos. Esses dados aproximam-se aos dados obtidos por Valencia *et al.* (2017) que apontaram uma idade média de 33 (CI: 26,9-43,8) e concordam com o facto de em Moçambique a TB seja maioritariamente notificada em indivíduos na faixa mais economicamente produtiva (PNCT, 2023) devido à maior exposição dos indivíduos a ambientes com potencial risco de transmissão.

O estado serológico para HIV foi positivo para 48,3% dos participantes e 51,7% foram HIV<sup>-</sup>, indicando que aproximadamente 5 em cada 10 participantes eram co-infectados com HIV. A frequência de coinfeção encontra-se ligeiramente abaixo das taxas de coinfeção TB/HIV reportadas por Mariner-Llicer *et al.* (2023) com uma frequência de coinfeção de 62,9% e Valencia *et al.* (2017) com 73,9% no distrito de Manhica, e encontram-se acima dos dados reportados pelo PNCT em 2022 que foi de 34% de coinfeção TB/HIV no país. O estado HIV

positivo é um dos maiores factores de ocorrência da tuberculose devido a contagem de células CD4+ o que condiciona o funcionamento do sistema de defesa do corpo do hospedeiro, facilitando a multiplicação da bactéria em estado dormente no hospedeiro (Duarte *et al.*, 2018). Esses dados evidenciam uma necessidade crescente de continuação de trabalhos de vigilância da tuberculose associada ao HIV e implementação de medidas para controlo destas infecções.

Dos participantes diagnosticados tuberculose positivos, 97,5% foram considerados casos novos, o que indica transmissão recente da bactéria nas comunidades do distrito de Manhiça. Esses dados concordam com os dados obtidos pelo PNCT (2019) em estudo realizado em 10 hospitais que atendem comunidades mineiras no norte de Moçambique ( $n=159$ ) e com Mariner-Llicer *et al.* (2023) ( $n=312$ ) e Valência *et al.* (2017) ( $n=276$ ) que indicaram uma maior frequência de novos casos de tuberculose no distrito de Manhiça.

A alta taxa de notificação da tuberculose como novo caso pode significar uma transmissão recente ao nível das comunidades do distrito devido a factores como os altos níveis de transmissão do vírus do HIV, o diagnóstico tardio da tuberculose que condiciona a transmissão familiar da tuberculose, o início tardio do tratamento, más condições sanitárias para maneio de pacientes, o que leva a infecção de pacientes tuberculose negativos (García-Basteiro *et al.*, 2016 e Saifodine *et al.*, 2013).

## **7.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *M. tuberculosis* complex através dos métodos de PCR por Xpert Ultra e Ensaio de sonda em linha (LPA)**

A primeira linha de tratamento de casos de tuberculose em Moçambique inclui a rifampicina e a isoniazida (Eddabra e Neffa, 2020 e Ho *et al.*, 2013). De um total de 120 isolados incluídos no estudo, 10,8% de isolados apresentaram mutações associadas a resistência aos antibióticos de primeira linha (isoniazida e/ou rifampicina), 4,2% apresentaram mutações associadas a monoresistência à rifampicina, 8,3% apresentaram mutações associadas a monoresistência à isoniazida. A frequência de isolados de *M. tuberculosis* multidroga resistente foi de 1,6%.

Um estudo realizado em clínicas do distrito de Mbagathi e em hospitais da comunidade de Chandaria, em Nairobi, Quênia, com um total de 132 pacientes tuberculose positivos,

reportou valores de resistência à isoniazida de 0,8%, rifampicina 0% e 0,8% de multirresistência, respectivamente. Essas frequências encontram-se abaixo das frequências obtidas neste estudo (Ogari *et al.*, 2019).

Um estudo do perfil de susceptibilidade na República democrática do Congo à nível nacional realizado com 1732 pacientes usando Xpert Ultra e sequenciamento genético resultou em uma frequência de resistência à rifampicina de 1,8% em novos casos e 17,3% em indivíduos com histórico de tratamento prévio para tuberculose, resistência à isoniazida de 6,6% em novos casos e 8,7% em casos com histórico de tratamento prévio para tuberculose, multirresistência de 0,9% em novos casos e 15,8% em casos com histórico de tratamento para tuberculose, dados estes que diferem dos dados obtidos neste estudo (Kamoyo *et al.* 2020).

Por outro lado, estudos em países da África Austral apresentam frequências de resistência aos antibióticos usados no tratamento da tuberculose próximos aos obtidos no presente estudo. Um estudo de Ismail *et al.* (2018) com 5423 isolados de *M. tuberculosis* complex na África do Sul, usando a cultura em meio líquido MGIT 960 para o teste de sensibilidade aos antibióticos reportou uma prevalência de 10,6% de resistência à pelo menos um dos antibióticos da primeira linha, 7,8% de monorresistência, 2,8% de multirresistência, 1,7% de monorresistência à rifampicina e 6,1% de monorresistência à isoniazida, dados estes que são muito próximos aos dados obtidos neste estudo.

Um estudo retrospectivo no laboratório de referência para cultura de tuberculose da Zambia realizou testes de susceptibilidade por cultura líquida a isolados de *M. tuberculosis* complex provenientes 811 pacientes, indicou resistência à pelo menos um antibiótico de 38,5%, multirresistência de 31,6%, 1,6% de monoresistência a rifampicina e 5,3% de monoresistentes a isoniazida, que são maiores em relação aos reportados neste estudo.

A alta frequência da tuberculose resistente nos países da África Austral pode ser explicada pelo alto índice de infecção por HIV na África do Sul que possui a segunda maior prevalência da tuberculose resistente mundialmente e é o país considerado centro de desenvolvimento comercial e industrial na África Austral, associado às más condições sanitárias para tratamento e controlo epidemiológico da tuberculose (Olson *et al.*, 2011).



As altas frequências de resistência aos antibióticos usados no tratamento contra a tuberculose observados na África Austral são também reportadas em outros países com alta prevalência da tuberculose, como é o caso Índia e China. Um estudo retrospectivo realizado no Centro de Controle e Prevenção da tuberculose de Dalian, província de Liaoning, China, usando a cultura líquida com um total de 6429 amostras de pacientes tuberculose positivos, indicou uma frequência de 9,09% de estirpes multirresistentes, 9,02% com monoresistência à isoniazida e 7,31% monoresistentes à rifampicina (Du *et al.*, 2023). Outro estudo realizado na Índia, por Prasad *et al.* (2019), usando o ensaio de sonda em linha em 2859 amostras tuberculose positivas, indicou frequências de monoresistência de 15,13% à isoniazida e 3,59% à rifampicina, e 12,54% de multirresistência. Esses dados aproximam-se aos dados reportados neste estudo.

Em Moçambique segundo dados do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) de 2022, o nível de MDR-TB em novos casos encontra-se em torno de 3,5% em casos novos e 11,2% em previamente tratados (PNCT, 2023), indicando que os níveis de casos reportados MDR-TB no distrito de Manhiça encontram-se abaixo do nível geral reportado no país.

Em estudos anteriores realizados no distrito de Manhiça em indivíduos de todas as idades apontaram uma prevalência de resistência à pelo menos um antibiótico de 15,9% (6,2% resistentes à rifampicina; 5,5% resistência à isoniazida e 3,7% multirresistentes) em 2014 e 14,4% (4,8% resistentes à rifampicina, 7,6% resistência à isoniazida e 2,5% multirresistentes) em 2018, respectivamente (Valencia *et al.*, 2017; Mariner-Llicer *et al.*, 2023). Esses valores podem evidenciar um decréscimo na prevalência de estirpes de *M. tuberculosis* complex resistentes circulantes no distrito de Manhiça o que marca um avanço no combate à tuberculose.

No presente estudo não foi identificado nenhum caso de resistência aos antibióticos em indivíduos previamente tratados para tuberculose, embora em Moçambique o diagnóstico de casos de resistência à rifampicina ocorra em cerca 20% em pacientes previamente tratados para tuberculose com os antibióticos de primeira linha (Gonzaga *et al.* (2021).

Dos 13 isolados com mutações associadas a resistência aos antibióticos da primeira linha, 2 (1,6%) foram multirresistentes e os restantes 11 (91,6%) e apresentaram monoresistência maioritariamente à isoniazida. Altos níveis de monoresistência à Isoniazida também foram

reportados em países com alta prevalência da tuberculose como é o caso da África do Sul, Zâmbia, Eswatini e Índia (Ismail *et al.*, 2018, Beckert *et al.*, 2020, Mutharaj *et al.*, 2017).

A existência de estirpes monoresistentes à isoniazida foi também observada por Valência *et al.* (2017) em 2014 e por Mariner-Llicer *et al.* (2023) em 2018, com prevalências 7,5% e 5,5%, respectivamente que alertaram para o rápido crescimento das estirpes monoresistentes à isoniazida no distrito de Manhica.

As causas apontadas para a ocorrência das monoresistências à isoniazida são a quimioprevenção da tuberculose em indivíduos HIV positivos que envolve a isoniazida em pequenas concentrações para redução do risco de ocorrência da tuberculose associada ao HIV e a transmissão comunitária de estirpes resistentes à isoniazida (Lacerda *et al.*, 2009) o que levanta a maior necessidade de vigilância na administração da isoniazida como tratamento profilático para tuberculose em indivíduos HIV positivos.

### **7.3. Comparação dos testes de susceptibilidade de isolados de *M. tuberculosis* complex pelos métodos Xpert MTB/RIF Ultra e Ensaio de sonda em linha**

O método de ensaio de sonda em linha permitiu a detecção de 13 isolados resistentes aos antibióticos, dos quais 5 isolados foram resistentes à rifampicina, um número maior ao detectado pelo Gene Xpert MTB/RIF Ultra que detectou 3 isolados resistentes à rifampicina.

Resultados similares quanto as diferenças na detecção de resistências à rifampicina pelos testes Gene Xpert e Ensaio de sonda em linha, foram observadas em estudos comparativos dos testes Xpert Ultra e Ensaio de sonda em linha, tendo sido registada maior sensibilidade e especificidade nos testes de sonda em linha que detectaram maior número de casos de resistência à rifampicina e o Xpert Ultra que registou uma grande margem de falsos resultados de sensibilidade quando comparados aos resultados do sequenciamento genético (Wadhwa *et al.*, 2022 e Rufai *et al.*, 2014). O limite de sensibilidade do método e a restrição ao gene *rpoB* do teste Xpert Ultra e a sua restrição a determinadas regiões deste gene é responsável pela não detecção de mutações associadas a resistência.

Outro estudo realizado no laboratório nacional de referência para tuberculose no Quênia contando com 329 amostras de pacientes presuntivos para tuberculose comparou resultados de diagnóstico de tuberculose e perfil de susceptibilidade obtidos a partir do Xpert Ultra e

ensaio de sonda em linha com o resultados de cultura líquida (MGIT), observou que o Ensaio de sonda em linha possui maior especificidade e sensibilidade que o Gene Xpert MTB/RIF Ultra, tendo detectado correctamente o *M. tuberculosis* complex e a susceptibilidade à rifampicina em mais de 99% das amostras contra 78% do teste Xpert Ultra (Aricha *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos neste estudo apontam uma concordância de 90,0% nos resultados de susceptibilidade à rifampicina e 4 isolados apresentaram resultados discordantes. A baixa sensibilidade e especificidade do teste Xpert Ultra afectam a performance do teste podendo dar falsos resultados de sensibilidade à rifampicina não devendo este ser usado como único teste para confirmação de multirresistência (Wadhwa *et al.*, 2022).

Apesar de casos de resistência à rifampicina detectada pelo Xpert Ultra indicar possível resistência à isoniazida e ser indicadora de multirresistência, Eddabra e Neffa (2020) e Wadhwa *et al.* (2022) indicaram a desvantagem do teste Xpert Ultra não diagnosticar monoresistências à isoniazida devido à sua restrição ao gene *rpoB*. (Eddabra e Neffa, 2020; Wadhwa *et al.*, 2022). Estes dados evidenciam a necessidade de uso do ensaio de sonda em linha para confirmação da multirresistência de amostras tuberculose positivas com mutações de resistência detectadas pelo teste Xpert Ultra.

## 8. Conclusões

Apesar do baixo número de amostras incluídas neste estudo, podem ser levantadas as seguintes conclusões:

- Os indivíduos tuberculose positivos atendidos no Hospital Distrital da Manhiça são na sua maioria do género masculino, na faixa etária dos 31-40 anos idade e maioritariamente HIV positivos.
- Os isolados de *M. tuberculosis* complex obtidos de pacientes adultos no Hospital Distrital da Manhiça são resistentes aos antibióticos de primeira linha, apresentando baixa frequência de resistência para à rifampicina e alta frequência de resistência à isoniazida.
- O método ensaio de sonda em linha apresenta maior eficácia na detecção de resistências aos antibióticos usados no tratamento da tuberculose em relação ao Gene Xpert MTB/RIF Ultra.

## **9. Limitações**

- Devido à falta de reagentes para o ensaio de sonda em linha, não foi possível aumentar o tamanho da amostra para assim aumentar a precisão dos resultados.

## **10. Recomendações**

- Contínua vigilância e uso adequado de isoniazida e rifampicina em indivíduos HIV positivos.
- Realização de estudos de monitoria dos casos de tuberculose associada ao HIV para o controlo de infecções da tuberculose resistentes a isoniazida;
- Uso de ensaios de sonda em linha para confirmação da multirresistência aos antibióticos de primeira linha e confirmação da susceptibilidade à rifampicina;
- Realização de estudos para verificar a relação entre os o histórico de tratamento e factores clínicos, e demográficos em casos da tuberculose e suas resistências.

## 11. Referências bibliográficas

1. Abraham, A.O., Nasiru, A.U., Abdulazeez, A.K., Seun, O.O. e Ogonna, D.W., 2020. Mechanism of Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 7(5):378-383
2. Adikaram, C.P., Perera, J. e Wijesunderal, S.S., 2012. Geographical Profile of *rpoB* Gene Mutations in Rifampicin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Sri Lanka. *Microbial Drug Resistance*. 18(5):525-531.
3. Barberis, I., Bragazzi, N.L., Galluzo, L. e Martini, M., 2017. The History of Tuberculosis: From The First Historical Records To The Isolation Of Koch's Bacillus. *J. Prev. Med. Hyg.* 58: 9-12.
4. Brandao, A.P., Pinhata, J.M.W., Oliveira, R.S., Galesi, V.M.N., Caiaffa-Filho, H.H., Ferrazoli, L., 2019. Agilizando o diagnóstico da tuberculose multirresistente em uma região endêmica com o uso de um teste comercial de sondas em linha. *Jornal Brasileiro de Pneumatologia*. 45(2): 1-8.
5. Costa, R. R., Silva, M. R. e Gonçalves, I. C., 2018. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura. *Revista Médica de Minas Gerais*. 28(5): 195-206.
6. Daniel, Thomas M., 2006. The History of Tuberculosis. *Respiratory Medicine*. 100:1862-1870.
7. Eddabra, R. e Neffa, M., 2020. Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Moroccan Patients: Systematic Review. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 1:1-8.
8. Feliciano, C. S., Namburete, E.I. Plaça, J.R., Peronni, K., Dippenaar, A., Warren, R.M. Silva Jr., W.A. e Bollela, V.R., 2018. Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique. *Tuberculosis* 110: 59–67.

9. Frith, John, 2014. History of Tuberculosis. Part 1 – Phthisis, Consumption And The White Plague. *Journal of Military and Veterans' Health*. 22(2): 29-35.
10. Garcia-Basteiro, A. L., Respeito, D., Augusto, O.J., López-Varela, E., Saco, C., Sequera, V.G., Casellas, A., Bassat, Q., Manhiça, I., Macete, E., Cobelens, F. e Alonso, P.L., 2016. Poor tuberculosis treatment outcomes in Southern Mozambique (2011–2012). *BMC Infectious Diseases*. 16(214): 1-9.
11. Garcia-Basteiro, A. L., Hurtado, J. C., Castillo, P., Fernandes, F., Navarro, M., Lovane, L., Casas, I., Quintó, L., Jordao, D., Ismail, M.R., Lorenzoni, C., Carrilho, C., Sanz, A., Rakislova, N., Mira, A., Alvarez-Martínez, M.J., Cossa, A., Cobelens, F., Mandomando, I., Vila, J., Bassat, Q., Menendez, C., Ordi, J. e Martínez, M.J., 2019. Unmasking the hidden tuberculosis mortality burden in a large post mortem study in Maputo Central Hospital, Mozambique. *Eur Respir J*. 54: 1-11
12. Gómez-Tangarife-Tangarife, V. J., Gómez-Restrepo, A.J., Robledo-Restrepo, J. e Hernández-Sarmiento, J. M., 2018. Resistencia a Medicamentos en *Mycobacterium tuberculosis*: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos. *Revista De Salud Pública*. 20 (4): 491-497.
13. Gonzaga, L. D. M., Gils, T., Decroo, T., Jacobs, B.K.M. e Lynen, L., 2021. Case Report: Therapeutic Threshold for Rifampicin-Resistant Tuberculosis in a Patient from Maputo, Mozambique. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 104(4):1317–1320.
14. Ismail N.A., Mvusi L. e Nanoo A., 2018. Prevalence of drug-resistant tuberculosis and imputed burden in South Africa: a national and sub-national cross-sectional survey. *Lancet Infect Dis*. 18(7):779-87.
15. Jang, J.G. e Chung, J.H., 2020. Diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Yeungnam University Journal of Medicine*. 37(4):277-285.
16. Kubica, G. P. ; Dye, W. E. ; Cow, M. L. ; Middle Brook, G., 1963. Sputum Digestion and Decontamination with N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide for Culture of Mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease*. 87(5):775-779.



17. Massabni, Antônio C. e Bonini, Eduardo H., (2019). Tuberculose: história e evolução dos tratamentos da doença. *Revista Brasileira Multidisciplinar*. 22(2): 1-29.
18. Medcalf, A., Altink, H., Saavedra, M. e Bhattacharya, S., 2013. *Tuberculose: Uma Breve História*, 1ª Edição. Orient Blackswan Private Limited.
19. Monde, N., Zulu, M., Tembo, M., Handema, Ray., Munyeme, M., Malama, S., 2021. Drug Resistant Tuberculosis In The Northern Region Of Zambia: A Retrospective Study. *Frontier In Tropical Diseases*. 2:1-10.
20. Nguenha, D., Manhiça, I., Garcia-Basteiro, A.L. e Cowan, J., 2018. Tuberculosis in Mozambique: Where Do We Stand? *Current Tropical Medicine Reports*. 5:264– 272.
21. Nathavitharana, R.R., Cudahy, P.G.T., Schumacher, Steingart, S.G., Pai, M. e Denkinger, C.M., 2017. Accuracy Of Line Probe Assays For The Diagnosis Of Pulmonary And Multidrug-Resistant Tuberculosis: A Systematic Review And Meta-Analysis. *European Respiratory Journal*. 49: 1-23.
22. O’Callaghan-Gordo, C., Díez-Padrisa, N., Abacassamo, F., Pérez-Breña, P., Casas, I., Alonso, P.L., e Roca, A., 2011. Viral Acute Respiratory Infections Among Infants Visited In A Rural Hospital Of Southern Mozambique. *Tropical Medicine and International Health*. 16(9): 1054–1060.
23. Perdigão, P., 2008. *Manual Clínico De Tuberculose: Apoio aos Cursos Clínicos*. 1ª Edição. Moçambique.
24. Prabhu, R. e V. Singh, 2019. The History Of Tuberculosis: Past, Present, and Future. *Advances in Microbiology*. 9: 931-942.
25. Programa Nacional de Controlo de Tuberculose, 2019. *Análise Do Perfil Epidemiológico Da Tuberculose Em Populações de Mineiros Nas Províncias De Manica, Tete, Zambézia E Cabo Delgado, No Período Compreendido Entre 2016-2018*. MISAU.
26. Programa Nacional de Controlo de Tuberculose, 2020a. *Avaliação E Manejo De Pacientes Com TB: Protocolos Nacionais*. 2ª Edição. MISAU.

27. Programa Nacional de Controlo de Tuberculose, 2020b. Relatório Anual do Programa: 2020.
28. Programa Nacional de Controlo de Tuberculose, 2023. Relatório Anual 2022.
29. Rufai SB, Kumar P, Singh A, Prajapati S, Balooni V, Singh S., 2014. Comparison of Xpert MTB/RIF with Line Probe Assay for Detection of Rifampin-Monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Jornal of Clininical Microbiology*. 52(6):1846-1852.
30. Saavedra, B., Mambuque, E., Gomes, N., Nguenha, D., Mabunda, R., Faife, L., Langa, R., Munguambe, S., Manjate, F., Cossa, A., Scott, L., e García-Basteiro, A.L. 2021. Diagnostic Performance Of The Abbott *Realtime* MTB Assay For Tuberculosis Diagnosis In People Living With HIV. *Nature*. 1(19271):1-12.
31. Singh, A., Gupta, A.K. e Singh, S., 2020. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Role of Nanoparticles Against Multi-drug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB). *NanoBioMedicine*. 1:285-314
32. Teferi, M.Y.; El-Khatib, Z.; Boltena, M.T.; Andualem, A.T.; Asamoah, B.O.; Biru, M.; Adane, H.T., 2021. Tuberculosis Treatment Outcome and Predictors in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18:1-15.
33. Valencia, S., Respeito, D., Blanco, S., Ribeiro, R. M., López-Varela, E., Sequera, V. G., Saavedra, B., Mambuque, E., Gómez Morillo, M., Bulo, H., Cobelens, F., Macete, E., Alonso, P. L., Caminero, J. A. e García-Basteiro, A. L., 2017. Tuberculosis drug resistance in Southern Mozambique: results of a population-level survey in the district of Manhica. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 21(4):446–451
34. World Health Organization, 2020a. Evaluation Of Centralized Assays For TB Detection And Detection Of Resistance To Rifampicin And Isoniazid: Who Technical Expert Consultation Report.
35. World Health Organization, 2020b. Global Tuberculosis Report 2020: Executive Summary.
36. World Health Organization, 2021. Global Tuberculosis Report 2021.

37. World Health Organization, 2014. Tuberculosis diagnostics Xpert MTB/RIF Test October 2013. Geneva.
38. Yu, X., Wen, Z., Chen<sup>1</sup>, G., Li, R., Ding, B., Yao, Y., Li, Y., Wu, H., Guo, X., Wang, H., e Zhang, S., 2014. Molecular characterization of Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from South-central in China. *The Journal of Antibiotics*. 67:291–297.
39. Zaw, M.T., Emran, N.A. e Lin, Z., 2018. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health*. 11 (2018) 605–610.

## Anexos

### 1. GeneXpert MTB/RIF Ultra

- i. Numa cabine de segurança, com auxílio de uma pipeta de Pasteur foi adicionar 1 mL da amostra a um tubo Falcon 15 mL e adicionar em seguida 2 mL de reagente Cepheid.
- ii. Depois o vórtex e deixar incubar por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois voltar a agitar e incubar por mais 5 minutos.
- iii. Após incubação, transferir 2 mL da mistura em um cartucho GeneXpert e levar à máquina GeneXpert para testagem e acompanhar o estado do teste até saída de resultados.
- iv. Os resultados são interpretados quanto a detecção de MTB e de mutação no gene *rpoB*.

### 2. Descontaminação da amostra

As amostras foram descontaminadas pelo método N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) de Kubica *et al.* (1963) para o processamento de expectoração).

- i. Em cabine de segurança, foi transferir a amostra de escarro para um tubo Falcon de 50 mL.
- ii. Em outro tubo Falcon de 50 mL adicionar uma mistura de NaOH 2% e citrato de sódio 2.9% até perfazer 50 mL e 1 g de reagente NALC. Em seguida, adicionou-se volume da mistura NALC-NaOH à amostra do falcon na proporção de volume 1:1. Agitar em vórtex e foi deixado incubar por 15 minutos à temperatura ambiente.
- iii. Adicionar, em seguida, o padrão fosfato salino (pH=6.6) até a boca do tubo e misturar fez-se centrifugação da mistura à 3000 g por 15 minutos.
- iv. Descartar o sobrenadante em tubo contendo fenol 5% e ressuspender o pellet 2 mL de padrão fosfato salino.

### 3. Cultura líquida em MGIT

Após descontaminação, as amostras foram semeadas em *Mycobacterium* Growth Indicator Tube (MGIT) (BD, Sparks, MD, USA). Para tal:

- i. Identificar tubos BD MIGIT's com os respectivos números de amostra e à cada um adicionar 800  $\mu\text{L}$  de suplemento de crescimento BACTEC MGIT, com uma micropipeta.
- ii. Em seguida, pipetar 500  $\mu\text{L}$  de amostra descontaminada ao respectivo tubo MGIT. Os tubos introduzir no aparelho BD BACTER MGIT 960 e esperar a leitura dos resultados de crescimento após 15-42 dias.
- iii. Para todos tubos positivos, seguir o processamento fazendo:
  - Teste rápido BD usando 4 gotas da cultura
  - Preparar lâmina da cultura e corar pela técnica Zeihl Neelsen
  - Cutivar a solução da cultura em Ágar Sangue para verificar contaminação