



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CULMINAÇÃO DE ESTUDOS
LICENCIATURA EM BIOLOGIA APLICADA

**Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* isolados em amostras de pacientes
referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose no período de Janeiro
de 2023 a Dezembro de 2024**

Autor: Melanie Cossa

Novembro de 2025



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CULMINAÇÃO DE ESTUDOS
LICENCIATURA EM BIOLOGIA APLICADA

**Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* isolados em amostras de pacientes
referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose no período de Janeiro
de 2023 a Dezembro de 2024**

Supervisores: Carla Maria Madeira, MSc.

Cláudio Abujate, Lic.

José Sumbana, PhD.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me guiar e fortalecer em todos os momentos da minha jornada acadêmica.

Aos meus pais, Mijulda Madeira e Jorge Cossa, pela dedicação, pelo amor incondicional e pelo investimento na minha educação. Obrigado por sempre acreditarem no meu potencial e por serem meu porto seguro. Aos meus irmãos, Márcio e Jorge, pelo carinho, incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

Ao pessoal do Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose (LNRT), em especial à Dra. Carla Maria Madeira e ao Dr. Jerônimo Langa, por abrirem as portas do laboratório para mim, pelo acolhimento e pela confiança no meu potencial. Meu profundo agradecimento a todos os colegas do laboratório pela calorosa recepção e pelo aprendizado compartilhado.

Aos meus supervisores, Prof. Doutor José Sumbana e dr. Cláudio Abujate, pela orientação, paciência e apoio em todas as etapas do meu projecto, contribuindo significativamente para o meu crescimento acadêmico e profissional.

À turma de Biologia Aplicada de 2021, por todos os momentos felizes que tornaram essa caminhada mais leve e especial.

Às minhas queridas “meninas”, amigas do Departamento de Ciências Biológicas que levarei para a vida toda Rucila e Joana, que marcaram minha trajetória na UEM com seu companheirismo e lealdade.

E, por fim, mas não menos importante, às minhas “buddys”, Anuarite, Rhindzela e Wendy, por todos os momentos em que nos apoiamos mutuamente durante os desafios acadêmicos, mesmo à distância. Sinônimo de amizade verdadeira

A todos vocês, meu sincero agradecimento!

Declaração de Honra

Eu, Melanie Jorge Mascarenhas Cossa, declaro por minha honra, que este trabalho é fruto da minha investigação sob orientação dos meus supervisores, Prof. Doutor José Sumbana, Msc. Carla Maria Madeira e Lic. Cláudio Abujate. A informação contida neste trabalho reflete a verdade e nunca foi apresentada em nenhuma instituição com vista a obter algum grau académico e todas as fontes foram verdadeiramente referenciadas.

Maputo, Novembro de 2025

(Melanie Cossa)

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que directa ou indirectamente contribuíram para que eu chegasse até este ponto. À minha família e amigos, muito obrigada!

“Nothing lasts forever but at least we got memories” - J Cole

Resumo

Introdução: A tuberculose (TB) continua sendo um problema de saúde pública devido a sua alta transmissibilidade e resistência antimicrobiana. O combate a TB constitui um desafio devido a ocorrência de infecções Multirresistentes e Extensivamente resistentes causadas por estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistentes em todo mundo. Em Moçambique regista-se maior número de casos notificados de Tuberculose Multirresistente em cerca de 4.800 novos casos de Tuberculose Multirresistente, havendo necessidade de estudos para a melhoria das estratégias de controle e mitigação da doença.

Objectivos: Caracterizar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *M. tuberculosis* isolados em amostras de pacientes referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024.

Metodologia: Foi realizado um estudo transversal descritivo, no qual foram analisadas 335 amostras colhidas em diferentes unidades sanitárias e referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose de Maputo, no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024. A análise de resistência foi feita através do método de *Line Probe Assay* (LPA) e os dados colhidos foram organizados em uma planilha no Excel. O teste de qui quadrado foi usado para avaliar as diferenças estatísticas entre os dois testes de avaliação do perfil de resistência.

Resultados: Um total de 335 amostras de *M. tuberculosis* foram analisadas, dos quais 73% (244/335) foram obtidos em indivíduos do sexo masculino e 27% (91/335) do sexo feminino, maiores de 15 anos (99%) e residentes na província de Maputo, principalmente no distrito da Matola (31%). Do total de 335 isolados de *M. tuberculosis* analisados, 40% (135/335) apresentaram resistência a pelo menos uma droga de primeira linha, 66% (89/135) foram classificados como tuberculose multirresistente, 34% (46/135) como tuberculose monorresistente a isoniazida, 8,8% (12/135) como tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) e 11% (15/135) como pré-extensivamente resistentes (pré-XDR-TB). Comparando os resultados observados entre as técnicas de *Line Probe Assay* e o Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos, pode-se observar que embora o LPA tenha se mostrado rápido e eficaz, alguns dos resultados apresentaram algumas discordâncias, para as duas linhas de tratamento da TB, indicando certa discordância entre os métodos.

Conclusão: A tuberculose resistente afectou principalmente indivíduos do sexo masculino maiores de 15 anos, com maior ocorrência na província de Maputo, especialmente em Matola e Boane. Os isolados de *M. tuberculosis* obtidos de amostras de pacientes referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose apresentam resistência aos antimicrobianos da primeira e segunda linha. Os métodos de *Line Probe Assay* e o Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos para tuberculose apresentaram 50% de concordância na testagem de drogas de primeira linha e 66,7% para drogas de segunda linha nos seus resultados. Ambos testes são eficazes para o diagnóstico da tuberculose resistente, havendo necessidade da sua combinação para o diagnóstico mais completo e fiável da tuberculose resistente.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Resistência; TB-DR; LPA; Mutações; Maputo.

Lista de abreviaturas e siglas

A-LYS -	Tampão de lise
A-NB -	Tampão neutralizante
ANTI-TB -	Anti-tuberculose
BCG-	Bacillus Calmette-Guérin
BDQ -	Bedaquilina
CON-C -	Reagente conjugado
CMTB -	Complexo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DR-TB -	Tuberculose resistente a drogas
ETM -	Etambutol
INH -	Isoniazida
INH^R -	Tuberculose monorresistente a isoniazida
INSIDA -	Inquérito Nacional sobre o impacto do HIV e SIDA em Moçambique
HCM -	Hospital Central de Maputo
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
HYB -	Reagente híbrido
LFX -	Levofloxacina
LPA -	<i>Line Probe Assay</i> , em Português Ensaio de sonda em linha
LNRT -	Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose
LZD -	Linezolid
MNT-	Micobactérias não tuberculosas
MTB -	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. Tuberculosis-</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NALC -	N-acetyl-L-cisteína
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PCR -	Reação de cadeia em polimerase
PNCT-	Programa Nacional de Controlo da Tuberculose
RIN -	Reagente <i>Rinse</i>
RNA -	Ácido ribonucleico

STR -	<i>Stringen wash</i> , em Português reagente de lavagem
SUB-C -	Substrato
TB -	Tuberculose
TB-DR -	Tuberculose droga resistente
TB – MR -	Tuberculose multirresistente
TB – RR -	Tuberculose resistente a rifampicina
TB XDR-	Tuberculose extensivamente resistente
TSA -	Teste de sensibilidade aos antibióticos
US -	Unidade Sanitária
WHO -	<i>World Health Organization</i> , em Português Organização Mundial da saúde
WT -	<i>Wild type</i> , em Português estirpe selvagem

Lista de símbolos e unidades

+ -	Cruzes
% -	Percentagem
°C -	Graus celcius
h -	Horas
μL -	Microlitros
mL -	Mililitros
rmp -	Rotações por minuto

Índice

Agradecimentos	i
Declaração de Honra	ii
Dedicatória	iii
Resumo	v
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Lista de símbolos e unidades	viii
Lista de figuras.....	11
Lista de tabelas.....	11
1. Introdução	12
1.1. Pergunta de pesquisa	14
1.2. Justificativa	15
2. Revisão bibliográfica.....	16
2.1. Etiologia e historial do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.1.1. Estrutura celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.1.2. Transmissão e mecanismo de acção de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> no hospedeiro ..	18
2.2. Epidemiologia	19
2.3. Diagnóstico da tuberculose	19
2.3.1. <i>Line probe assay</i> (LPA)	20
2.3.2. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana	22
2.4. Tratamento	22
2.4. Mecanismo de acção dos fármacos isoniazida e rifampicina sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
2.4.1. Isoniazida	23
2.4.2. Rifampicina	24
2.5. Causas e tipos da tuberculose resistente.....	25

3. Objetivos	28
3.1. Objectivo geral.....	28
3.2. Objectivos específicos.....	28
3.3. Hipótese nula (H0)	28
3.4. Hipótese alternativa (H1)	28
4. Área de estudo	29
5. Metodologia	31
5.1. Tipo de estudo	31
5.2. Considerações éticas.....	31
5.3. População do estudo	31
5.4. Critérios de Inclusão e Exclusão	31
5.4.1. Critérios de inclusão	31
5.4.2. Critérios de exclusão	32
5.5. Método de amostragem	32
5.6. Procedimentos de colheita, processamento laboratorial de amostras e gestão de dados	32
5.6.1. Processamento laboratorial das amostras incluídas no estudo	32
5.6.2. <i>Line Probe Assay</i>	34
5.6.2.1. Preparação das amostras de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
6. Resultados	37
6.1. Características sociodemográficas dos pacientes com tuberculose	37
6.2. Perfil de suscetibilidade das estirpes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aos antimicrobianos	38
6.3. Concordância entre os métodos genotípicos (<i>MTBDRplus</i> e <i>MTBDRsl</i>) e fenotípico (teste de suscetibilidade antimicrobiana)	41
7. Discussão.....	42
7.1. Características sociodemográficas dos pacientes com tuberculose.....	43

7.2. Perfil de suscetibilidade das estirpes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aos antimicrobianos	44
7.3. Concordância entre os métodos genotípicos (MTBDRplus e MTBDRsl) e fenotípico (teste de suscetibilidade antimicrobiana)	47
8. Limitações do estudo	48
9. Conclusão	49
10. Recomendações do estudo	50
11. Referências bibliográficas	51

Lista de figuras

Figura 1- Representação esquemática da estrutura celular do <i>M. tuberculosis</i> .	17
Figura 2- Representação esquemática dos diferentes alvos dos fármacos de tratamento de tuberculose em drogas de primeira linha rifampicina (RIF) e isoniazida (INH)	25
Figura 3- Fita de leitura e interpretação do resultado de LPA <i>genotype MTBDRplus</i> fornecida pelo fabricante.	21
Figura 4- Mapa da localização do Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose no distrito municipal de KaMpfumo.	29

Lista de tabelas

Tabela 1 . Descrição dos genes e enzimas produtoras e o seu efeito perante uma mutação.	27
Tabela 2 . Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com tuberculose	38
Tabela 3 . Perfil de resistência de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> usando o método de LPA.	38
Tabela 4 . Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com tuberculose resistente	39
Tabela 5. Mutações referentes ao perfil de suscetibilidade detectadas pelo LPA	Error! Bookmark not defined

1. Introdução

A tuberculose (TB) continua sendo uma ameaça a saúde global, não só devido a sua alta transmissibilidade, mas também devido a variação genética da *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), principal agente etiológico da doença. Trata-se de uma bactéria intracelular álcool-ácido resistente que possui uma parede celular que apresenta um alto teor lipídico, para além de possuir açúcares, proteínas e carboidratos (Natarajan *et al.*, 2020).

A tuberculose é predominantemente identificada como uma infecção pulmonar (tuberculose pulmonar), e pode também afectar outras regiões do corpo, como os gânglios linfáticos e a pleura, causando a tuberculose extrapulmonar, que corresponde a aproximadamente 15% dos casos (Barros, 2021). A transmissão ocorre através da inalação de aerossóis contaminados, mas, a doença somente se desenvolve quando o bacilo se instala nos pulmões e é fagocitado por macrófagos alveolares, podendo desenvolver-se em doença activa ou permanecer em estado latente contido em granulomas (Chai, 2018; Costa *et al.*, 2021).

Estima-se que 7,4 milhões casos recém diagnosticados e 1,6 milhões de mortes foram registados em todo mundo em 2022, afectando na sua maioria, indivíduos do sexo masculino, representando cerca de 55% dos casos totais e 410.000 indivíduos desenvolveram tuberculose multirresistente ou monoresistência a rifampicina (TB – MR/RR-), representando 3,3% de indivíduos previamente diagnosticados e 17% dos casos novos (WHO, 2023).

Moçambique faz parte dos 30 países de alerta da tuberculose tendo alcançado mais 551 casos por 100.000 habitantes, na sua maioria indivíduos com HIV. Estima-se que em 2022, cerca de 10.000 indivíduos desenvolveram TB -MR/RR, superando os casos de resistência verificados no ano anterior, onde observou-se cerca de 4.800 casos de MR/RR-TB (WHO, 2023; Weller, 2023).

O diagnóstico da tuberculose pode ser realizado por exames clínicos e laboratoriais. O clínico inclui o raio X do tórax para avaliações iniciais em caso de suspeita, observando a presença de cavidades, nódulos, consolidações, processos intersticiais e outros, decorrentes da inflamação que ocorre durante o processo infeccioso. Os métodos laboratoriais incluem a observação microscópica, para a detecção rápida do bacilo e testes moleculares como o Xpert MTB/RIF e *Line Prob Assay* (LPA), que detectam não só a presença do *M. tuberculosis*, mas também a sua

resistência aos principais fármacos de primeira linha (Rifampicina e Isoniazida), a cultura e o teste de sensibilidade fenotípico aos antibióticos (TSA) em meio sólido (Lowenstein-Jensen) ou líquido (tubo indicador de crescimento do *Mycobacterium* – MGIT) (MISAU, 2019; Tassinari *et al.*, 2021).

O tratamento da tuberculose sensível envolve um regime de 6 meses, dividido em uma fase intensiva de dois meses com Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH), Pirazinamida (PZA) e Etambutol (ETM), seguida por quatro meses de manutenção com RIF e INH (Gill, 2021). Já a tuberculose resistente apresenta uma duração do tratamento mais prolongada com combinações de fármacos de acordo com a resistência apresentada (MISAU, 2019).

A resistência de algumas estirpes de *M. tuberculosis* está associada a vários factores extrínsecos e intrínsecos, como factores sociais relacionados aos sistemas de controlo e prevenção bem como aquisição de mutações espontâneas no genoma do bacilo, respectivamente (Allué-Guardia *et al.*, 2021). Essas mutações conferem diferentes padrões de resistência, classificados como (Gill *et al.*, 2021; Viney *et al.*, 2021):

- Tuberculose Monorresistente compreende a resistência a apenas um fármaco anti-tuberculose, com excepção da rifampicina;
- Tuberculose multirresistente (MR-TB) sendo a resistência da tuberculose a pelo menos isoniazida e rifampicina;
- Pré-XR-TB, que preenche os requisitos da RR-TB/MR-TB e qualquer fluoroquinolona;
- Tuberculose extensivamente resistente (XR-TB) que preenche os requisitos da RR-TB/MR-TB e adicionalmente possuam resistência a qualquer fármaco do grupo A (LFX, MFX, BDQ e LZD)

A identificação precoce do perfil de resistência do *M. tuberculosis* poderá orientar aos profissionais para o uso da dosagem adequada dos medicamentos. Para tal, faz-se o uso de métodos fenotípicos que incluem a avaliação do crescimento em meio líquido ou sólido contendo o antibiótico e métodos moleculares, em destaque, o ensaio de sonda em linha (GenoType MTBDR plus) que detecta o bacilo e determina a resistência a fármacos pela amplificação e hibridização de uma amostra positiva de MTB (Miggiano *et al.*, 2020; Pinhata, 2020; Acharya *et al.*, 2019).

Dado o aumento dos casos de TB resistente em Moçambique e a necessidade de um diagnóstico preciso, o estudo tem como propósito avaliar o perfil de resistência de *M. tuberculosis* em amostras Referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024.

1.1. Pergunta de pesquisa

As estirpes selvagens, ou seja, aquelas sem nenhuma mutação, têm respondido positivamente ao tratamento preconizado pela OMS, composto por uma fase intensiva de 2 meses com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguida por uma fase de continuação de 4 meses com isoniazida e rifampicina (Nascimento *et al.*, 2023). Entretanto, devido a diversos factores, como abandono do tratamento, mau uso e irregular da medicação prescrita, o *M. tuberculosis* não responde de forma positiva aos fármacos, indicando a presença de alguma forma de resistência (Rabahi *et al.*, 2016).

Diante dessa situação, a identificação precoce das resistências em *M. tuberculosis* contribui para orientação dos profissionais na escolha de um tratamento mais eficaz, permitindo combinações de medicamentos mais personalizadas para cada paciente. A detecção torna-se possível graças ao desenvolvimento de tecnologias moleculares de última geração, com destaque para o ensaio de sonda em linha (LPA). Neste contexto, este estudo busca responder à seguinte questão:

Qual é o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos em amostras de pacientes referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose (LNRT) no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024?

1.2. Justificativa

Em Moçambique, onde a tuberculose associada ao HIV é uma preocupação de saúde pública importante, a detecção precoce e precisa de casos de TB-MDR/RR é crucial para orientar o tratamento eficaz e reduzir a transmissão da doença (MISAU, 2019). A resistência da *M. tuberculosis* aos fármacos antituberculose constitui um desafio significativo, especialmente devido ao surgimento de estirpes multirresistentes e extremamente resistente à droga (XDR-TB), que complicam ainda mais o tratamento e aumentam a morbidade e a mortalidade associada à doença. Além disso, as taxas de abandono e o mau uso da medicação prescrita podem contribuir para o desenvolvimento de resistência aos fármacos, tornando ainda mais premente a necessidade de uma abordagem eficaz para detetar e tratar a tuberculose.

O ensaio de sonda em linha (LPA) é uma técnica molecular rápida e sensível que permite a detecção de mutações associadas à resistência aos principais fármacos anti-TB directamente de amostras clínicas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda uso de LPA comerciais como um teste inicial para detetar resistência a fármacos de primeira linha para cultura positiva ou teste directo e microscopia positiva, por forma a evitar a administração incorrecta dos medicamentos e consequente progresso do estado clínico do paciente (Acharya *et al.*, 2019). É fundamental a realização de estudos para melhorar os resultados do tratamento, reduzir a disseminação da doença e mitigar os impactos sociais e económicos associados à tuberculose resistente.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Etiologia e historial do *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis é um agente etiológico da doença com maior morbilidade em seres humanos do que qualquer outra patologia de origem bacteriana, é um bacilo álcool ácido resistente, pertencente ao género *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, Subordem *Corynebacterineae*, Ordem *Actinomycetales*.

O género *Mycobacterium* possui mais de 50 espécies capazes de causar doenças em seres humanos e animais conhecidas como patógenos obrigatórios ou oportunistas, e pode ser subdividido em três grupos: micobactérias não tuberculosas (MNT) que inclui mais de 40 espécies, o *M. leprae* e o complexo *M. tuberculosis* (CMTB) composto por: *M. tuberculosis*, que causa a tuberculose humana, *M. bovis*, responsável pela TB bovina, *M. bovis subsp caprae*, causador da TB em caprinos; *M. africanum*, estirpe de TB humana detectada no continente africano, *M. microti*, que causa TB em roedores, *M. pinnipedii*, causador da TB em leões marinhos e em humanos e *M. canettii*, estirpe de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália. As bactérias pertencentes a este grupo apresentam 99,9% de similaridade genética, no entanto diferem-se pela forma de patogenicidade, epidemiologias, características fenotípicas, entre outras aspectos (Wildner *et al.*, 2011; Pinhata, 2020).

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas conhecidas pela humanidade, sendo responsável por elevada mortalidade desde a antiguidade. Registros históricos indicam a presença da doença em textos médicos chineses, datados de aproximadamente 5.700 anos, e nos Vedas indianos, com cerca de 3.500 anos. Durante os séculos XVIII e XIX, em plena era da industrialização, a TB esteve associada à concentração de trabalhadores em ambientes urbanos com condições socioeconómicas precárias, fatores que favoreceram a disseminação deste patógeno causador da doença caracterizado como “doença do povo” ou “da multidão”. Esse período de alta incidência foi gradualmente seguido por uma redução das taxas de adoecimento e mortalidade, processo que ocorreu antes mesmo do surgimento dos primeiros antibióticos e da introdução da vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (Barbier & Wirth, 2017).

No início e até meados do século XX, apesar da introdução da vacina BCG e dos primeiros fármacos, o tratamento da tuberculose ainda se baseava principalmente no internamento em

sanatório (hospitais especializados em tratamento de tuberculose) e procedimentos cirúrgicos. Com o desenvolvimento dos antibióticos, entre 1944 e o início da década de 1950, essas práticas começaram a perder importância e foram substituídas pelas novas terapias (Pezzela, 2019).

As novas linhas de tratamento da TB foram fundamentais porque permitiram reduzir significativamente a mortalidade e melhorar os resultados clínicos dos pacientes. No entanto, o surgimento de estirpes resistentes aos antibióticos incluindo a tuberculose multirresistente e extensivamente resistente passou a constituir um grande desafio até aos dias de hoje, evidenciando a importância do presente estudo.

2.1.1. Estrutura celular do *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis apresenta um modo de vida intracelular facultativo, respiração aeróbica, com taxas de crescimento relativamente lentas e apresenta uma estrutura da parede celular complexa e rica em lipídios. É composta por um complexo denominado de complexo micolil arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) que consiste em três macromoléculas: peptidoglicano (PG) em ligação covalente com o arabinogalactano (AG), que por sua vez está ligado aos ácidos micólicos. A parte superior é composta por lipídios livres como fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), os lipídios contendo ftiocerol, lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM) (Brennan, 2003).

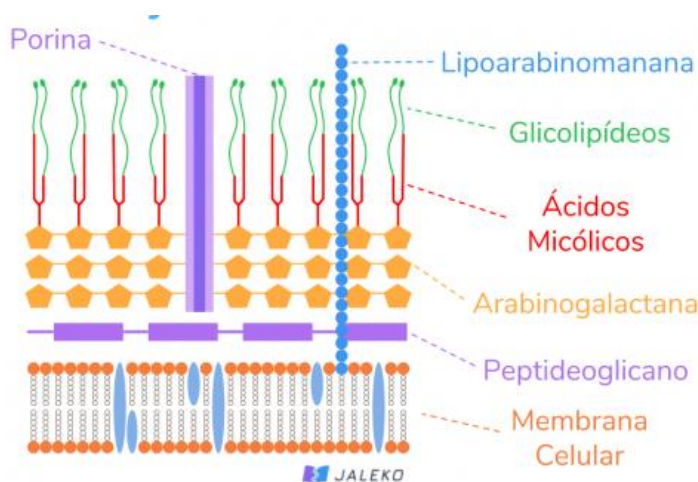


Figura 1- Representação esquemática da estrutura celular do *M. tuberculosis*.

Fonte: (Jaleko, 2019).

Por estarem à superfície da parede celular, os ácidos micólicos desempenham um papel crucial na virulência, antigenicidade, entrada de nutrientes e consequente crescimento, na resistência a processos do sistema imune (acção de enzimas lisossomas), antibióticos e agentes químicos e hidrofobicidade do próprio bacilo químicos. Com isto pode-se salientar que a síntese de ácidos micólicos constituem um processo crucial para a sobrevivência do bacilo no hospedeiro (Johanneke *et al.*, 2011).

2.1.2. Transmissão e mecanismo de acção de *Mycobacterium tuberculosis* no hospedeiro

A tuberculose é transmitida pela inalação de aerossóis contaminados. O bacilo da tuberculose entra nos pulmões e é fagocitado por macrófagos alveolares. Este bacilo possui mecanismos para evitar a destruição dentro dos macrófagos, impedindo a fusão dos fagossomas com os lisossomas, incluindo a síntese de uma proteína chamada PknG. O sistema imunológico responde de duas maneiras: formando granulomas ao redor das células infectadas recrutando outras células do sistema imune, em pessoas com sistema imunológico saudável ou resultando em doença ativa em pessoas imunocomprometidas. A maioria das pessoas infectadas controla a infecção, resultando em tuberculose latente. (Chai, 2018; Costa *et al.*, 2021).

Estima-se que cerca de um quarto da população mundial esteja infectada de forma latente com *M. tuberculosis*. Entre esses indivíduos, calcula-se que de 5 a 15% possam desenvolver tuberculose activa nos primeiros dois anos após a infecção latente. Os demais indivíduos infectados pelo bacilo, embora permaneçam em estado de latência, continuam expostos a um risco constante de reativação da doença, especialmente se ocorrerem factores que comprometam o seu sistema imunológico (Gong, 2021).

O sistema imune de um indivíduo pode estar comprometido por vários factores, principalmente uso de drogas imunossupressoras, infecção por HIV, malnutrição e envelhecimento. A tuberculose pode-se desenvolver para a sua fase activa, onde o MTB escapa do granuloma e alcança outras partes do pulmão, causando tuberculose pulmonar activa, ou pode ser transportada para outras partes do organismo através da circulação (tuberculose miliar), este tipo de

tuberculose e mais comum em indivíduos de idade mundo baixa, idosos e indivíduos portadores do HIV (Barros, 2021).

2.2. Epidemiologia

Estima-se que 7,4 milhões casos recém diagnosticados e 1,6 milhões de mortes foram registados em todo mundo em 2022, afectando na sua maioria, indivíduos do sexo masculino, representando cerca de 55% dos casos totais e 410.000 indivíduos desenvolveram tuberculose multirresistente ou monoresistência a rifampicina (TB-MDR/RR) representando 3,3% de indivíduos previamente diagnosticados e 17% dos casos novos (WHO, 2023).

Em África, especificamente na África subsaariana onde se situa Moçambique, a tuberculose continua sendo um desafio de saúde pública apresentado taxas elevadas da doença e representando 26% dos casos novos na sua maioria indivíduos portadores de HIV (O fundo global, 2017).

Moçambique faz parte dos 30 países de alerta da tuberculose estabelecidos pela OMS, tendo alcançado mais de 551 casos por 100.000 habitantes, na sua maioria indivíduos com HIV. Estima-se que em 2022, cerca de 10.000 indivíduos desenvolveram TB -MR/RR, superando os casos de resistência verificados no ano anterior, onde observou-se cerca de 4.800 casos de MR/RR-TB (WHO, 2023; Weller, 2023).

De acordo com informações divulgadas pelo Ministério da Saúde (MISAU), através do Programa Nacional de Controlo da Tuberculose (PNCT), foram diagnosticados e notificados, em 2018, um total de 93.546 novos casos de tuberculose (MISAU,2019). Dentre esses, 1.206 casos foram classificados como tuberculose multirresistente (TB-MDR/RR). Estes números ressaltam a magnitude do desafio que a tuberculose continua a representar em Moçambique, especialmente considerando o impacto das formas resistentes, que demandam tratamentos mais complexos e prolongados, além de recursos laboratoriais e clínicos especializados (Balate *et al.*, 2022).

2.3.Diagnóstico da tuberculose

O diagnóstico da tuberculose pode ser feito através de exames clínicos ou confirmação laboratorial. O clínico realiza-se através do raio X do tórax para avaliações iniciais em caso de suspeita, observando a presença de cavidades, nódulos, consolidações, processos intersticiais e outros, decorrentes da inflamação associado ao processo infeccioso (Nachiappan *et al.*, 2017). O

teste laboratorial inclui a observação microscópica, usando amostras de expectoração ou amostras extrapulmonares, para a detecção rápida do bacilo, testes moleculares como o Xpert MTB/RIF e *Line Prob Assay* (LPA), que detectam não só o bacilo da TB, mas também a resistência genotípica a pelo menos 1 ou 2 fármacos da primeira linha de tratamento da tuberculose (rifampicina e isoniazida), a cultura e o TSA em meio sólido (Lowenstein-Jensen) ou líquido (tubo indicador de crescimento do *Mycobacterium* – MGIT) (PNCT, 2019; Tassinari *et al.*, 2021).

O diagnóstico correcto da resistência que o paciente apresenta, demonstra-se crucial para a tomada de decisão pelo clínico das combinações de fármacos a qual administrar ao paciente, evitando assim disseminação da doença e regressão do progresso clínico do paciente (Naidoo *et al.*, 2023).

2.3.1. *Line probe assay* (LPA)

O LPA é um ensaio de sonda em linha que simultaneamente detecta a presença da *M. tuberculosis* e mutações em genes associadas as resistências aos fármacos de primeira linha e segunda linha (LPAplus e LPA_{sl}, respectivamente) em amostras clínicas ou culturas positivas (Ninan *et al.*, 2016). Ela utiliza tecnologias como a PCR e a hibridização em três etapas: extracção do DNA, amplificação por reacção de cadeia em polimerase (PCR) e hibridização reversa (Armstrong, 2018).

As tiras de LPA plus possuem um total de 27 zonas de reacção (bandas), incluindo seis controles que verificam o conjugado, a amplificação, o complexo *M. tuberculosis* (TUB) e os genes *rpoB*, *katG* e *inhA*. Além disso, elas contêm oito sondas correspondentes às regiões do tipo selvagem de *rpoB* (WT1–WT8) e quatro sondas para mutações (MUT D516V, MUT H526Y, MUT H526D e MUT S531L). No caso do gene *katG*, há uma sonda do tipo selvagem e duas sondas para mutações (MUT S315T1 e MUT S315T2). Para o gene *inhA*, estão presentes duas sondas do tipo selvagem e quatro sondas para mutações específicas (MUT1 C15T, MUT2 A16G, MUT3A T8C e MUT3B T8A) (Figura 3). A identificação de resistência baseia-se na ausência de uma banda correspondente ao tipo selvagem ou na presença de uma banda indicando mutação. (ECDC, 2013).

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. Fita de leitura e interpretação do resultado de LPA *genotype* MTBDRplus fornecida pelo fabricante.

Fonte: (WHO, 2022).

O LPA de primeira linha oferece uma elevada precisão na detecção de resistência a medicamentos anti-tuberculose, com uma sensibilidade de 98,2% e especificidade de até 97,8% para a identificação de resistência à rifampicina em testes directos. No caso da resistência à isoniazida, o LPA demonstra uma sensibilidade de 95,4% e uma especificidade de 98,8%. Apesar de sua alta eficácia na identificação das mutações mais comuns associadas a estirpes resistentes, o LPA possui certas limitações: algumas mutações que conferem resistência estão situadas fora das regiões-alvo cobertas pelo teste, tornando impossível excluir completamente a presença de resistência mesmo quando todas as sondas wild type (WT) estão presentes. Por essa razão, é sempre mais indicado recorrer a testes fenotípicos adicionais de sensibilidade a medicamentos para garantir uma avaliação mais precisa da presença de estirpes resistentes (WHO, 2022; Naidoo, 2023).

2.3.2. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Os métodos fenotípicos baseados em cultura incluindo o teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) permanecem como o padrão ouro para a identificação de resistência a medicamentos, devido à sua elevada precisão e confiabilidade. No entanto, a realização desses testes requer um investimento significativo em infraestrutura laboratorial avançada, incluindo equipamentos especializados (Ahmad *et al.* 2016; Saktiawati *et al.*, 2024).

A amostra confirmada de *M. tuberculosis* é submetida a cultivo em meios sólidos ou líquidos que contêm a concentração crítica previamente estabelecida de um determinado fármaco anti-TB permitindo assim avaliar a resposta do bacilo à presença do medicamento (WHO,2018). A ausência de crescimento da bactéria ao longo do período de incubação indica que a estirpe é sensível ao fármaco testado, entretanto, o crescimento detectável de pelo menos 1% de crescimento, indica a presença de resistência aos fármacos em análise. Além disso, o cultivo não apenas confirma a resistência ou sensibilidade, mas também fornece informações cruciais sobre a concentração inibitória mínima (MIC) que pode ser definida como a menor concentração do fármaco necessária para inibir de forma eficaz o crescimento do bacilo, oferecendo informações importantes para o desenho de estratégias terapêuticas. (Yussof *et al.*, 2022).

Os métodos automatizados baseados em cultura líquida, usando o BACTEC MGIT 960, oferecem uma alternativa mais rápida. Esse sistema utiliza tubos contendo o meio líquido, enriquecido com um composto fluorescente encapsulado em silicone. A fluorescência do composto é sensível à presença de oxigênio dissolvido no meio e 0.1mL da droga liofilizada é adicionada em cada tubo (ECDC, 2023). A medida que os microrganismos consomem o oxigênio disponível durante seu crescimento, o composto fluorescente se torna progressivamente mais ativo, emitindo uma fluorescência detectável pelo equipamento. Esse mecanismo permite a detecção precisa do crescimento bacteriano, tornando o processo mais rápido e eficiente (Simons, 2011).

2.4.Tratamento

O primeiro fármaco efectivo contra a tuberculose foi estreptomicina descoberto em 1943, 60 anos após a descoberta do bacilo. A estreptomicina foi isolada em laboratório e um ano depois um paciente com tuberculose activa foi tratado com o fármaco e declarado curado da doença

(Riccardi *et al.*, 2020). Entretanto, por mais que muitos pacientes fossem curados da doença, uma parte deles apresentavam relapsos, foi então que em 1944 dois novos fármacos foram descobertos e introduzidos no sistema de tratamento juntamente com a estreptomicina, fazendo com que as taxas de cura aumentassem e as de resistência diminuíssem. Em 1951 a isoniazida foi descoberta e introduzida para uso, seguida do desenvolvimento dos fármacos pirazinamida, cycloserina, ethionamida, rifampicina e etambutol (Keshavjee, 2012).

Actualmente, a isoniazida permanece sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento da tuberculose e, independentemente do esquema terapêutico, é administrada ao longo de todo o tratamento, juntamente com a rifampicina (Nascimento *et al.*, 2023).

A abordagem terapêutica actual da tuberculose sem suspeita de resistência, constitui na administração de 4 fármacos de primeira linha, o padrão recomendado pela OMS, fase intensiva de 2 meses com isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB), seguida por uma fase de continuação de 4 meses com isoniazida e rifampicina (MISAU, 2019).

No entanto, em alguns pacientes os isolados de *M. tuberculosis* são resistentes aos fármacos de primeira linha devido a factores intrínsecos ou extrínsecos como: abandono, mau e irregular uso da medicação prescrita, aspecto socioculturais e económicos e mutações, sendo assim são implementadas estratégias alternativas administrando-os com fármacos de segunda linha principalmente fluoroquinolonas, etionaminada, bedaquilina e linezolida (Rahbahi *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2024).

2.4. Mecanismo de acção dos fármacos isoniazida e rifampicina sobre *Mycobacterium tuberculosis*

2.4.1. Isoniazida

A actividade antimicrobiana da Isoniazida foi descoberta em 1951 sendo considerado como fármaco padrão da quimioterapia anti-tuberculose em Moçambique e a redor do mundo (Velo, 2007).

O bacilo de *M. tuberculosis* é rodeado de uma camada cerosa espessa composta por vários ácidos graxos que impedem ou impactam a capacidade da maioria dos fármacos de penetrar a parede

celular do bacilo e atingir o meio intracelular, o citoplasma, sendo o principal destes componentes os ácidos micólicos (Tonge *et al.*, 2007).

O mecanismo de acção da isoniazida envolve a inibição da síntese dos ácidos micólicos, presentes na parede celular que causa a sua impermeabilidade. A isoniazida é um pró-fármaco que precisa de ser activado para exercer a sua função, essa activação é dada pela enzima catalase-peroxidase (katG) que converte a isoniazida em um metabólito activo, produzindo radicais reactivos de oxigénio e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo (Santos *et al.*, 2012). Ao ser oxidada, a isoniazida gera intermediários eletrofilicos capazes de inativar o InhA. O InhA é um gene que codifica a enzima enoil-ACP redutase na via de biossíntese de ácidos graxos tipo II(FAS-II) da micobactéria, responsável pelo alongamento dos ácidos micólicos presentes na parede celular do bacilo. No entanto, embora existam evidências convincentes de que o InhA é um dos alvos primários para a actividade antimicrobiana da isoniazida, vários estudos indicam que o modo de acção da isoniazida é complexo, sugerindo a possibilidade de múltiplos alvos na célula para a forma activada da droga, incluindo KasA, a β -cetoacil-ACP sintase do sistema FASII (Tonge *et al.*, 2017).

2.4.2. Rifampicina

A rifampicina inibe a transcrição genética da micobactéria por bloqueio da RNA polimerase DNA dependente, através da formação de um complexo fármaco-enzimático estável, levando ao bloqueio da iniciação da formação da cadeia o que impede a síntese de RNA mensageiro, produzindo morte celular, especificamente a subunidade β , codificada pelo gene rpoB, dessa enzima complexa constitui o local de acção da Rifampicina (Unissa, 2017).

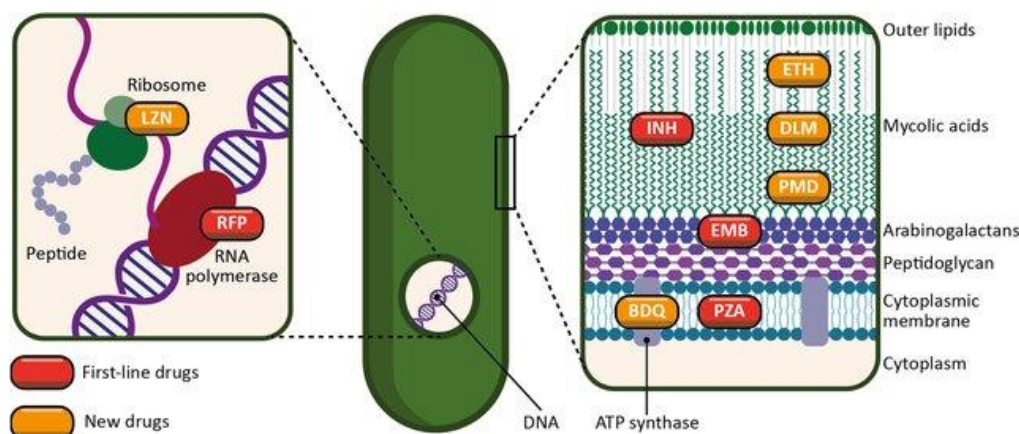


Figura 3- Representação esquemática dos diferentes alvos dos fármacos de tratamento de tuberculose em drogas de primeira linha rifampicina (RIF) e isoniazida (INH), sendo os ácidos micólicos presentes na parede celular de *M. tuberculosis* o alvo da isoniazida e o DNA do bacilo o alvo da rifampicina.

Fonte: (Eaton & Ware, 2015).

2.5. Causas e tipos da tuberculose resistente

A tuberculose resistente a medicamentos representa uma das mais graves epidemias globais de resistência a medicamentos transmitida pelo ar, sendo responsável por aproximadamente um terço de todas as mortes associadas à resistência antimicrobiana, com impacto particularmente significativo em casos novos (Bahttarai, 2023).

Alguns pacientes não respondem positivamente a ação dos antibióticos anti-tuberculose, dentre as principais causas da resistência, a limitada quantidade de fármacos efetivos, os períodos longos de tratamento, fraca aderência por parte dos pacientes e mutações em genes específicos contribuíram para o surgimento de estirpes mutantes que ganharam resistência aos fármacos. (Eaton & Ware, 2015; Pacheco, 2017).

As estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes, pré-extensivamente resistentes e extensivamente resistente vem emergindo na última década. A resistência de estirpes *M. tuberculosis* pode ser classificada em categorias distintas: TB monorresistente, a tuberculose multirresistente (MDR-TB/RR), a tuberculose pré-extensivamente resistente (pré-XDR) e a tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) (Viney, 2021).

A TB monorresistente compreende a resistência a apenas um fármaco anti-tuberculose, com exceção da rifampicina, a tuberculose multirresistente (MDR-TB) compreende a resistência da

tuberculose a isoniazida e rifampicina em simultâneo, a pré-extensivamente resistente (pré-XDR), que preenche os requisitos da TB-MDR/RR e pelo menos uma fluoroquinolona em simultâneo e a tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) que preenche os requisitos da TB-MDR/RR, qualquer fluoroquinolona e adicionalmente pelo menos uma droga do grupo A de drogas injectáveis. (Gill *et al.*, 2021; Viney *et al.*, 2021).

A resistência a isoniazida foi identificada pela primeira vez em 1952, o mesmo ano em que este fármaco foi introduzido como parte da terapia contra a tuberculose. Desde então, estudos têm demonstrado que uma única mutação missense no gene *InhA* de *M. tuberculosis* é suficiente para conferir resistência à isoniazida, representando um dos principais mecanismos deste fenómeno. Além disso, sabe-se que a resistência também pode ser atribuída a mutações que resultam em substituições de aminoácidos na região codificante do gene *katG*. Nessas situações, a proteína codificada frequentemente apresenta uma substituição específica, onde a serina na posição 315 é trocada por treonina, uma alteração que reduz significativamente a eficácia do fármaco (Pym *et al.*, 2002; Palomino & Martin 2014).

Em casos mais raros, a resistência pode ainda ser consequência da deleção completa do gene *katG*, o qual codifica a catalase-peroxidase *katG*, uma enzima crucial para a ativação da isoniazida dentro do bacilo. Esses processos moleculares sublinham a complexidade da resistência aos medicamentos e o impacto das mutações genéticas na eficácia terapêutica. (Kaijinson, 2015; Pacheco, 2017).

Estudos recentes demonstraram que, além das mutações nos genes *katG* e *InhA*, a resistência a isoniazida também pode ser conferida por mutações na região promotora do operão *mabA–inhA*, resultando na superexpressão da enzima *InhA*. Essas mutações na região promotora do operão *mabA–inhA* ou no gene *InhA* geralmente estão associadas a um nível mais baixo de resistência à isoniazida e ocorrem com menor frequência quando comparadas às mutações no gene *katG* (Palomino & Martin 2014; Dookie, 2018).

Foi observado que a mutação silenciosa em *mabA* pode conferir resistência à isoniazida em *M. tuberculosis* ao aumentar os níveis de transcrição do gene *InhA* (Ando *et al.*, 2014; Kydenia *et al.*, 2018).

A uma percentagem mais baixa, há ainda outros genes que podem conferir resistência ao bacilo, como na região promotora *aphC* e na região codificante *kasA*, embora os mecanismos por detrás destes ainda não estejam bem descritos (Kiepiela, 2000).

Os mecanismos genéticos que conferem resistência à isoniazida ocorrem por três processos distintos: bloqueio da activação da droga (*katG*), pela inativação do intermediário tóxico (para a bactéria) da INH (*aphC*) e bloqueio da biossíntese do ácido micólicos (*mabA* e *InhA*) (Campos, 1999; Badawy *et al.*, 2023).

A hipótese de que as mutações são os principais causadores da resistência aos medicamentos sublinha a relevância das alterações no gene *rpoB*, que comprometem a afinidade da rifampicina pela RNA polimerase. Essas mutações modificam os resíduos do sítio de ligação da rifampicina na subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*), tornando o antibiótico menos eficaz. Estudos tem demonstrado que mutações em genes-alvo, diretamente ligados ao mecanismo de ação dos fármacos anti-TB, representam o principal mecanismo para o surgimento da resistência em *M. tuberculosis* (Santos *et al.*, 2012)

As mutações associadas podem ser desde alterações num único nucleotídeo até pequenas inserções e deleções cujo acontecem em uma região de 81 pb do gene *rpoB*, chamada de região determinante de resistência à rifampicina (RRDR), que compreende os códons 507-533 (Pinhata, 2020).

Tabela 1. Descrição dos genes e enzimas produtoras e o seu efeito perante uma mutação. (Eaton e Ware, 2015)

Gene mutado	Enzima	Efeito da mutação
<i>katG</i>	Catalase Peroxidase	Isoniazida não é activada no bacilo
<i>InhA</i>	Redutase enoil-acil da proteína carregadora (ACP)	Permite a produção de ácidos micólicos
<i>kasA</i>	Beta-cetoacil ACP sintase	Permite a produção de ácidos micólicos por meio de mecanismos desconhecidos
Região promotora <i>ahpC</i>	Hidroperoxidase alquil	Associada a mutações no gene <i>katG</i> . O aumento da expressão desta enzima proporciona uma acção antioxidante que compensa a ausência de actividade catalase induzida pelas mutações no <i>katG</i>

MabA (promotor do <i>inhA</i>)	NADPH dependente beta-ketoacyl redutase	Diminui a síntese enoyl-ACP reductase, o que impede a síntese de ácidos micólicos
<i>rpoB</i>	Modificação da subunidade b da RNAP	A rifampicina não se consegue conectar ao RNA

3. Objetivos

3.1. Objectivo geral

Caracterizar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos em amostras de pacientes referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose (LNRT) no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024

3.2. Objectivos específicos

- Descrever as características sociodemográficas dos pacientes com tuberculose;
- Determinar o perfil de susceptibilidade das estirpes de *M. tuberculosis* aos antimicrobianos através de métodos genotípicos “*genotype MTBDRplus e MTBDRsl*”;
- Comparar concordância entre os métodos genotípicos *genotype MTBDRplus*, *MTBDRsl* e testes de susceptibilidade antimicrobiana fenotípicos, na detecção de resistência aos antimicrobianos de *M. tuberculosis*.

3.3. Hipótese nula (H0)

- As estirpes de *M. tuberculosis* isoladas em amostras referenciadas ao LNRT no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024 são sensíveis aos fármacos utilizados para o tratamento e não apresentam mutações significativas aos genes associados a estas resistências (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *gyrB*, *eis* e *rrs*).

3.4. Hipótese alternativa (H1)

- As estirpes de *M. tuberculosis* isoladas em amostras referenciadas ao LNRT no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024 são resistentes aos fármacos utilizados para o tratamento e apresentam mutações significativas aos genes associados a estas resistências (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *gyrB*, *eis* e *rrs*).

4. Área de estudo

O presente estudo, inclui amostras provenientes de diferentes US localizadas na província e cidade de Maputo, processadas no Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose (LNRT), pertencente ao Instituto Nacional de Saúde (INS), localizado distrito de KaMphumo, bairro central, recinto do Hospital Central de Maputo (HCM), na Av. Agostinho Neto 1106 (figura 4) (INS,2023).



Figura 4. Mapa da localização do *Laboratório* Nacional de Referência da Tuberculose no distrito municipal de KaMphumo.

Fonte: ArcGis, 2021 (ArcMap, versão 10.3).

O LNRT desempenha um papel essencial no diagnóstico, controle e monitoria do tratamento da tuberculose em Moçambique. Por ser uma instituição de referência, o LNRT utiliza tecnologias avançadas em comparação com à maioria dos hospitais e unidades sanitárias locais. Essa infraestrutura permite ao laboratório fornecer respostas mais aprofundadas sobre a bactéria (MISAU, 2018).

O LNRT é responsável por realizar exames especializados como a cultura de micobactéria, testes de sensibilidade a medicamentos genotípicos que permitem a detecção rápida de infecções e mutações associadas à resistência a antimicrobianos e fenotípicos que permitem a detecção fenotípica de resistências aos antimicrobianos. Além disso, o laboratório tem a função de dar apoio técnico aos laboratórios do SNS, melhoria contínua dos laboratórios de tuberculose do país, por meio da implementação de painéis de testagem, elaboração de directrizes, validação de tecnologias e pesquisa (Viegas *et al.*, 2011).

O LNRT é uma instituição-chave na luta contra a tuberculose em Moçambique contribuindo para a redução da mortalidade e da morbilidade relacionadas à tuberculose e na mitigação dos efeitos da resistência aos medicamentos (A verdade, 2011).

5. Metodologia

5.1. Tipo de estudo

O estudo foi transversal descritivo e retrospectivo com base em dados previamente processados nos anos de 2023-2024, e colhidos em Fevereiro de 2025, sem acompanhamento ao longo do tempo, com o objectivo de descrever as variáveis da população.

5.2. Considerações éticas

O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pela comissão científica da Faculdade de Ciências (N./Ref. 2.12/04/DCB/FC) (Anexo 1). Importa destacar que os dados colhidos no presente estudo foram utilizados exclusivamente para fins académicos, no âmbito da elaboração e defesa da tese de Licenciatura.

O estudo baseiou-se exclusivamente em dados secundários, sem qualquer interacção com os pacientes. Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com os princípios éticos em pesquisa, garantindo a proteção, privacidade e confidencialidade dos dados utilizados.

5.3. População do estudo

A população do estudo incluiu amostras de expectoração, líquido pleural, cefalorraquidiano, sinovial, urina e fezes colhidas em pacientes com suspeita de tuberculose nas US da cidade e província de Maputo, referenciadas ao LNRT para cultura e testes de sensibilidade aos antibióticos da primeira (rifampicina, isoniazida, streptomina, etambutol e pirazinamida) e segunda linha de tratamento da tuberculose (bedaquilina, linezolida, moxifloxacina, levofloxacina, delamanida, etionamida, ampicilina, canamicina, capreomicina e clofazimina).

5.4. Critérios de Inclusão e Exclusão

5.4.1. Critérios de inclusão

Foram incluídas no presente estudo amostras referenciadas por diferentes unidades sanitárias da Cidade e Província de Maputo com as seguintes características:

- Amostras de expectoração, líquidos corporais, entre outros, com diagnóstico de tuberculose por microscopia que apresentam resultados de 1+; 2+, 3+, que tenham resultado disponível no LPA;
- Amostras com baciloscopia negativa ou escassa, mas cultura positiva;

- Cultura positiva identificada como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* CMTB.

5.4.2. Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo determinadas amostras que não atendiam aos critérios de inclusão estabelecidos. Não fizeram parte da amostragem:

- Amostras de expectoração, líquidos pleural, cefalorraquidiano e sinovial, urina, entre outros com microscopia negativa;
- Amostras de expectoração, líquidos pleural, cefalorraquidiano e sinovial, urina, entre outros com microscopia positiva, mas sem resultados disponíveis do LPA;
- Culturas negativas ou contaminadas;
- Culturas não identificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (CMTB).

5.5.Método de amostragem

Foram seleccionadas 385 amostras, dos quais 335 amostras foram elegíveis para as análises devido a factores como não cumprimento dos critérios de inclusão e dados demográficos incompletos.

As amostras foram seleccionadas por amostragem aleatória simples (sorteio) de 16 amostras por mês, utilizando o aplicativo *Random Generator vrs 2.2.12*. A selecção considerou os resultados disponíveis no sistema DISA Reports, garantindo que, se houvesse 55 amostras, 16 seriam sorteadas.

5.6. Procedimentos de colheita, processamento laboratorial de amostras e gestão de dados

A fonte de dados para o presente estudo, foi a base de dados interna do Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose (LNRT), utilizada para a avaliação dos resultados do LPA e do TSA das amostras previamente processadas entre Janeiro de 2023 e Dezembro de 2024. Esta base foi obtida através do “Sistema DISA Reports” e da leitura das pastas de resultados disponíveis no LNRT.

5.6.1. Processamento laboratorial das amostras incluídas no estudo

As amostras analisadas neste estudo, compreendendo expectoração, líquidos pleural, cefalorraquidiano e sinovial, urina, entre outros tipos clínicos, foram processadas na rotina do laboratório e referenciadas por diversas unidades sanitárias da cidade e província de Maputo, de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024 para cultura e TSA. Após a recepção e registo no

sistema DISA, as amostras foram processadas e descontaminadas por método NALC-NaOH (LNRT, 2025).

As amostras foram submetidas a testes de diagnóstico e resistência, nomeadamente baciloscopia, cultura em meios sólidos (Löwenstein-Jensen) e líquidos (MGIT 960), bem como ao ensaio molecular *Line Probe Assay* (LPA) (LNRT, 2024).

Os resultados validados inseridos no sistema DISA foram exportados para análise. A gestão de dados incluiu selecção das amostras válidas, releitura dos resultados do LPA, interpretação dos resultados, organização em planilhas do Excel/SPSS.

5.6.1.1. Material biológico

- Amostras de expectoração, líquido pleural, cefalorraquidiano e sinovial urina e fezes de casos presumidos de tuberculose.

5.6.1.2. Material químico

- Água destilada;
- CON-C;
- Kit de amplificação genotype MTBDRPLUS A-AM e B-AM;
- Kit de extracção genolyse
- Solução de desnaturação;
- Soluções HYB e STR;
- Solução Rinse (RIN);
- SUB-C;
- Tampão lise(A-LYS) e neutralizante (A-NB);

5.6.1.3. Instrumentos

- Micropipetas de 10, 20, 100, 200, e 1000 µL;
- Criotubos de 1mL;
- Pontas de pipeta descartáveis, estéreis e com filtro;
- Papel absorvente
- Marcadores;
- Pinça;
- Luvas descartáveis;
- Máscara;

5.6.1.4. Equipamentos

- Termociclador
- Banho-Maria
- Cafeteira
- CBS
- centrífuga
- GT-BLOT 48

5.6.2. *Line Probe Assay*

5.6.2.1. Preparação das amostras de *Mycobacterium tuberculosis*

1. Na cabine de biossegurança, descontaminou-se 500 μL das amostras clínicas usando o método NALC-citrato-NaOH e colocadas na centrifuga a 3000g por 15min;
2. Após a descontaminação e centrifugação, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 2mL de tampão fosfato.
3. Com auxílio de uma pipeta de pasteur, inoculou-se 500 μL no meio líquido (MGIT) e 100 μL no meio sólido (Lowesntein-Jensen) e simultaneamente fez-se lâminas para análise microscópica;
4. As amostras com microscopia positivas com 1- 3+ ou culturas positivas (MIGT) e detectadas como pertencentes ao CMTB pelos testes imunocromatográficos, foram selecionadas para a extração do DNA pelo método de *genolyse* (LNRT, 2024).

5.6.2.2. Extracção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*

1. O kit *Genolyse* (lotJD0098, validade 14-03-2025) foi usado para a extracção do DNA das amostras usando as instruções fornecidas pelo fabricante;
2. Colocou-se 1mL da amostra em um tubo e centrifugou-se por 15 minutos a 10000rpm;
3. Descartou-se o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta de 1000 μL ;
4. Ao pellet obtido anteriormente, 100 μL do tampão lise(A-LYS) foi adicionado e misturado com o auxílio do vortex e incubado em banho-maria a 95°C por 5 minutos;
5. Após isto, adicionou-se 100 μL da solução neutralizante (A-NB) e misturou-se novamente no vortex;
6. Centrifugou-se as amostras na rotação máxima(15000rpm) por 5 minutos.
7. Após a centrifugação, 200 μL do sobrenadante, líquido que contém o DNA, é extraído e colocado em um novo tubo;
8. Reservar a 20°C até o uso posterior.

5.6.2.3. Amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis*

1. Após o descongelamento, centrifugou-se brevemente AM-A e AM-B e misturou-se cuidadosamente com uma pipeta, pipetando de para cima e para baixo;
2. Na cabine de biossegurança adicionou-se os componentes da reação de amplificação, onde para cada amostra adicionou-se 10 μL AM-A, 35 μL de AM-B para 5 μL de solução do NDA, completando um volume final de 50 μL ;
3. Em cada tubo de PCR previamente enumerados, adicionou-se 45 μL do mastermix;
4. Em uma área específica para a adição do DNA, inoculou-se 5 μL do DNA no mastermix previamente preparado;
5. Levou-se os tubos para o termociclador (Bio-Rad T100 Thermal Cycler) seguindo o protocolo “TB CLINIC”;
6. Os parâmetros da PCR foram: 1 ciclo a 95°C por 15 min, 10 ciclos a 95°C por 30 s e 65°C por 2 min, 20 ciclos a 95°C por 25 s, 50°C por 40 s e 70°C por 40 s, e um ciclo final de 8 min a 70°C, por um total de aproximadamente 3h;
7. Após completar os ciclos, armazenou-se os produtos da PCR na geleira até a realização da etapa de hibridização.

5.6.2.4. Hibridização

A hibridização foi feita usando o GT-blot-48 (Hain Lifescience– A Bruker Company), este equipamento automatizado foi projectado para a etapa de hibridização e revelação na técnica do LPA. Ele processa 2 a 48 tiras simultaneamente, controlando temperatura, tempo de incubação e lavagem para garantir a padronização dos resultados (Bruker, 2025).

1. Aqueceu-se em banho-maria os frascos de 100 mL contendo as soluções de HYB e STR a 37-45°C antes de as usar, com auxílio de água quente;
2. Em um tubo adequado, diluiu-se 1:100 o Conjugado Concentrado (CON-C, laranja) e o Substrato Concentrado (SUB-C, castanho) com as quantidades necessárias dos respetivos tampões (CON-C com CON-D, SUB-C com SUB-D). Agitou-se bem e deixou-se estabilizar à temperatura ambiente, podendo coloca-los no GT-blot-48 na sua respectiva posição, juntamente com os outros reagentes (Rinse);

3. Enquanto isso, identificou-se todas as tiras necessárias para a execução (consoante o número de amostras);
4. Na bandeja específica do GT-Blot, dispensou-se 20 μL da solução DEN no canto inferior de cada pista da bandeja;
5. Adicionou-se 20 μL do produto de PCR à solução DEN em cada pista e pipetou-se para cima e para baixo algumas vezes para garantir uma boa mistura;
6. Deixou-se a mistura repousar por 5 minutos em temperatura ambiente;
7. Colocou-se a tira correspondente na pista respectiva;
8. Inseriu-se a bandeja no GT-Blot;
9. Após isto retirou-se o HYB e o STR do banho-maria e colocou-se na sua respectiva posição no GT-blot;
10. Iniciou-se o programa chamado "GT-48";
11. Ao término do programa, removeu-se as tiras usando uma ponta de 1000 μL e colou-se na folha de resultados fornecida;
12. Como forma de manutenção do equipamento, colocou-se água destilada morna em um recipiente adequado, e nele, mergulhou-se todos os tubos nela e iniciou-se os ciclos de limpeza do equipamento;
13. Interpretou-se os resultados com o auxílio da ficha de avaliação disponibilizada pelo fornecedor.

6. Resultados

6.1. Características sociodemográficas dos pacientes com tuberculose

O presente estudo teve como objectivo geral caracterizar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *M. tuberculosis* obtidos de amostras de pacientes referenciadas ao Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose (LNRT) no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024 no qual foram incluídas 335 amostras de pacientes provenientes de unidades sanitárias localizadas na cidade e província de Maputo.

A Tabela 2 apresenta a distribuição das principais variáveis clínicas e proveniência das 335 amostras incluídas no estudo. Verificou-se um predomínio de indivíduos sexo masculino, que representou 73% (244/335) dos casos de TB, enquanto o sexo feminino correspondeu a 27% (91/335). A maioria dos indivíduos encontrava-se na faixa etária >15 anos correspondente a 99% (332/335), indicando que a infecção acometeu predominantemente indivíduos adultos, sendo apenas 1% dos casos registados em <15 anos.

No que diz respeito à proveniência, verificou-se que a maioria das amostras era proveniente da Matola 31% (103/335), seguida pelos distritos de Khampfumo 15% (49/335), Manhiça 8% (28/335), Kamavota 8% (26/335), Nlhamanculo 7% (24/335), Boane 6% (20/335) e Kamubukwane 6% (19/335). As baixas frequências de pacientes com tuberculose identificadas pelo LPA, foram principalmente observadas no distritos de Marracuene 4% (15/335), Magude 3% (9/335), Katembe 1% (4/335) e Moamba 1% (2/335), tabela 2.

Cerca de 55% (185/335) dos pacientes foi classificada como “caso novo”, enquanto 45% (150/335) tinham histórico de tratamento prévio de tuberculose, indicando uma alta incidência de infecções recentes.

Variável	Categoria	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Sexo	Masculino	244	73%
	Feminino	91	27%
Idade	>15	332	99%
	<15	3	1%

Proveniência	Magude	9	3%
	Kamubukwane	19	6%
	Matola	103	31%
	Nlhamanculo	24	7%
	Namaacha	17	5%
	Boane	20	6%
	Manhiça	28	8%
	Kamavota	26	8%
	Kamaxakeni	17	5%
	Marracuene	15	4%
	Khampfumo	49	15%
	Moamba	2	1%
	Katembe	4	1%
Categoria clínica do paciente	Previamente tratado	150	45%
	Caso novo	185	55%
Total		335	

Tabela 2-Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com tuberculose

6.2. Perfil de suscetibilidade das estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* aos antimicrobianos

Com vista a avaliar o perfil de susceptibilidade das estirpes de *M. tuberculosis*, foi realizado o LPA, um teste molecular que identifica a presença do bacilo e simultaneamente detecta mutações em genes que conferem resistência aos antimicrobianos usados para o tratamento da tuberculose. Desta forma foi possível testar a sensibilidade e identificar as diferentes estirpes resistentes de *M. tuberculosis*, conforme está descrito na Tabela 3. O perfil de sensibilidade das 335 amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, evidenciou que 60% (200/335) foram sensíveis aos antibióticos utilizados no tratamento da tuberculose. Por outro lado, 135 (40% (135/335) amostras demonstraram resistência a pelo menos um fármaco antituberculose (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* usando o método de LPA.

Perfil de susceptibilidade	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Natureza da amostra
Sensível	200	60%	
Resistente a pelo menos uma droga	135	40%	Clínicas =

Tuberculose multiresistente/ resistentes a rifampicina	89	66%	310
Tuberculose monorresistente a isoniazida	46	34%	
Tuberculose pré-extensivamente resistente	15	11%	
Tuberculose extensivamente resistente	12	8,8%	
			Culturas=25
Total	335		335

Entre as 135 amostras foram identificados diferentes tipos de estirpes resistentes. As formas mais frequentes foram as estirpes multiresistente (MDR/RR), totalizando 66% (89/135) e 34% (46/135) monorresistente à isoniazida (INH^R), 11% (15/135) pré-extensivamente resistentes (Pré-XDR) e 8,8% (12/135) extensivamente resistentes (XDR). A tabela 4 apresenta algumas das características demográficas e clínicas das 135 amostras que apresentaram resistência a pelo menos uma droga de tratamento da tuberculose.

Tabela 4. Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com tuberculose resistente

Variáveis	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Proveniência		
Maputo Cidade	48	36%
Maputo Província	87	64%
Sexo		
Feminino	38	28%
Masculino	97	72%
Idade		
>15 anos	129	96%
<15 anos	6	4%
Categoria de tratamento		
Caso previamente tratado	64	47%
Caso novo	71	53%
Total	135	

Observa-se que a maioria das amostras resistentes foi proveniente da província de Maputo 64%,(87/135), enquanto 36% (48/135) foram da cidade de Maputo. Para além disso, verificou-se

uma predominância de pacientes de sexo masculino 72% (97/135) com uma percentagem 44% superior em relação ao pacientes do sexo feminino 28% (38/135), evidenciando uma maior ocorrência de tuberculose resistente entre os indivíduos do sexo masculino.

Em relação à faixa etária, verificou-se que grande maioria dos pacientes tinha idade superior a 15 anos 96% (129/135), demonstrando que a tuberculose resistente afectou principalmente indivíduos adultos.

No que se refere à categoria clínica, 53% (71/135) dos pacientes não apresentavam histórico de tratamento prévio, sendo considerados novos casos, enquanto 47% (64/135) foram classificados como pacientes previamente tratados, indicando que estes já passaram por tratamento de TB previamente.

As resistências do *Mycobacterium tuberculosis* são determinadas por mutações em genes específicos. Essas mutações podem ser identificadas pela técnica em estudo, o Line Probe Assay (LPA).

No presente estudo, 43% (34/80) das amostras TB-MDR/RR apresentaram mutações simultâneas nos genes rpoB e katG e 33% (26/80) apenas no gene rpoB. No que concerne a tuberculose monoresistente a isoniazida cerca de 59% (26/44) das mutações ocorreram no gene katG.

Das amostras pré-extensivamente resistentes, 100% (16/16) das mutações ocorreram no gene gyrA e 75% (9/12) das mutações de estirpes extensivamente resistente ocorreram simultaneamente nos genes gyrA e rrs responsáveis por resistências as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. A tabela abaixo apresenta as mutações detectadas pelo LPA nas estirpes resistentes analisadas.

Tabela 5 Mutações referentes ao perfil de susceptibilidade detectadas pelo LPA

Mutações referentes ao perfil de susceptibilidade detectadas pelo LPA				
Genes	Multiresistente	Monoresistente a isoniazida	Pré extensivamente resistente	Extensivamente resistente
rpoB	26(33%)			
katG	-	26(59%)		
InhA	-	16(36%)		
InhA/katG	-	2(5%)		
rpoB/katG	34(43%)	-		

rpoB/InhA	13(16%)	-		
rpoB/InhA/katG	7(9%)	-		
gyrA			16(100%)	
gyrB				
rrs				
eis				
gyrA/rrs				9(75%)
gyrA/eis				2(16.6%)
gyrA/rrs/eis				1(8.3%)
Total	80	44	16	12

6.3. Concordância entre os métodos genotípicos (*MTBDRplus* e *MTBDRsl*) e fenotípico (teste de susceptibilidade antimicrobiana)

Com o objectivo de avaliar a concordância entre métodos, foram comparados os resultados obtidos pelo método de LPA (método molecular de detecção de mutações associadas à resistência) e TSA, (método fenotípico baseado na resposta do bacilo à presença do fármaco), ambos referentes às drogas de primeira linha e segunda linha, no entanto apenas foi possível analisar 16 amostras e 15 amostras para as drogas de primeira e segunda linha, respectivamente, devido a desafios enfrentados durante a testagem do TSA.

A análise da concordância entre os métodos LPA e TSA demonstrou variação conforme a categoria de resistência. Entre as 10 amostras classificadas como multirresistentes pelo LPA, cerca de 60% (6/10) foram concordantes com o TSA. A concordância para monorresistências à isoniazida foi de 50% (2/4). Nas amostras classificadas como sensíveis pelo LPA, não houve concordância com o TSA.

De forma geral, considerando todas as categorias, a concordância total entre os métodos LPA e TSA para antimicrobianos de primeira linha foi de 50% (8/16).

O nível de concordância de um total de 15 isolados de *M. tuberculosis* foi analisado para TSA e LPA relativamente aos antimicrobianos de segunda linha, e constatou-se uma concordância geral de 66,7% (10/15). Das pré-extensivamente resistentes pelo LPA 66,7% (2/3) foram

concordantes. Na categoria extensivamente resistente, não foi observada concordância, 72,7% (8/11) das amostras classificadas como sensíveis pelo LPA foram concordantes.

7. Discussão

7.1. Características sociodemográficas dos pacientes com tuberculose

No presente estudo foram consideradas variáveis como a idade, sexo, proveniência das amostras e o histórico de tratamento prévio de tuberculose, com vista a compreender a resistência da tuberculose.

A província de Maputo apresentou um maior número de casos de tuberculose resistente em comparação com a cidade de Maputo. Na província de Maputo, os distritos da Matola e de Boane destacaram-se por registarem o maior número de casos de tuberculose resistente em ambas as estirpes, além de um número significativo dos casos de tuberculose multirresistente (TB-MDR/RR) ao longo do período estudado. Esse cenário pode ser explicado pelo facto de a tuberculose ser uma doença de fácil disseminação, associada a diversos factores de risco. Entre eles, destacam-se a alta densidade populacional e a migração transfronteiriça de trabalhadores para minas de minério, especialmente na África do Sul. Muitos desses trabalhadores, co-infectados com HIV e TB, retornam ao País, contribuindo significativamente para os altos níveis da doença na região (Titosse *et al.*, 2021; ONU, 2022). Estudos prévios avaliaram a incidência da tuberculose em diferentes províncias de Moçambique destacando a cidade de Maputo, com o maior número de casos de TB resistente a fármacos (DR-TB), representando 20% do total de casos da doença no País (António, 2019), o que evidencia a necessidade a necessidade de continua vigilância.

Os indivíduos do sexo masculino com mais de 15 anos apresentaram um maior número de casos de TB resistente no presente estudo. Os homens são frequentemente considerados os principais provedores do lar e, ao atingirem a idade produtiva, muitos optam por migrar para a vizinha África do Sul em busca de melhores condições de vida, trabalhando em minas. Assim, este movimento migratório os expõe a ambientes de alto risco para a transmissão da tuberculose, especialmente quando há co-infecção com HIV (Barwise, 2013).

Além disso, alguns estudos sugerem que as mulheres tendem a ser mais cuidadosas e menos negligentes em relação à própria saúde, buscando atendimento médico com maior frequência e aderindo melhor ao tratamento, o que pode contribuir para uma menor incidência de TB resistente entre elas (Macêdo *et al.*, 2021). No entanto, estudos desenvolvidos por Berru *et al.* (2018) apontam que entre os 5 e 25 anos de idade, a taxa de mortalidade por tuberculose nas

mulheres é cerca de 1,5 a 2 vezes superior à dos homens, as explicações sugeridas pelo autor incluem a má alimentação e o papel das hormonas sexuais, havendo necessidade de protecção de ambos os sexos.

Um total de 47% dos casos de tuberculose resistente foi identificada em pacientes previamente tratados. A influência do tratamento prévio da doença, incluindo casos de abandono, falência terapêutica e mutações espontâneas contribuem para o aparecimento da TB resistente (Pires *et al.*, 2014). No entanto, os casos novos notificados foram mais frequentes que os casos previamente tratados, representando um total de 53%. Esse facto evidencia uma maior disseminação das formas resistentes da doença, o que exige maior atenção das autoridades de saúde e dos programas de controle da tuberculose. Estes achados indicam que a estirpe resistente está sendo transmitida de pessoa para pessoa, tornando cada vez mais comum a disseminação da tuberculose primária resistente (Figueiredo, 2024).

7.2. Perfil de suscetibilidade das estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* aos antimicrobianos

No presente estudo analisamos um total de 335 amostras ao longo de dois anos, dos quais 60% eram sensíveis aos fármacos de primeira linha, enquanto 40% apresentaram resistência a pelo menos um deles. Esses achados são alarmantes, especialmente quando comparados a um estudo realizado na província de Sofala, que avaliou 87 isolados de *M. tuberculosis*, dos quais 37,9% apresentaram algum tipo de resistência, enquanto 62,1% permaneceram sensíveis, demonstrando uma tendência crescente de 2,1% em relação a estudos anteriores (Namburete *et al.*, 2016).

A tuberculose multirresistente foi a forma mais comum de resistência identificada, correspondendo a 27% dos casos totais e 66% entre as amostras resistentes a pelo menos um antibiótico. Esse dado é preocupante, pois a isoniazida (INH) e a rifampicina (RIF) são os fármacos mais antigos e eficazes no tratamento da TB em Moçambique. Resultados similares foram obtidos em um estudo realizado no Hospital Distrital de Manhiça (MDH) em 2016 na província de Maputo, que relatou uma prevalência de resistência a fármacos em 15,9% das amostras. Adicionalmente, esse estudo demonstrou que as taxas de resistência foram 10,1% para isoniazida, 6,2% para rifampicina, 4,0% para estreptomicina, 3,6% para etambutol e 1,1% para pirazinamida (Valencia *et al.*, 2016). Estudos mais recentes confirmam essa tendência crescente da TB resistente a medicamentos, apontando que a proporção de casos de TB-MDR/RR em

Maputo aumentou ao longo dos anos analisados, de 2009 a 2017 (Pires, 2021). O risco de tuberculose multirresistente (TB-MDR/RR) evoluir para formas pré-extensivamente resistentes e extensivamente resistentes é elevado. Essas formas apresentam resistência a um número ainda maior de fármacos, os quais são menos eficazes e frequentemente associados a efeitos adversos graves, especialmente em pacientes que fazem uso de múltiplos medicamentos. (Arbex et al., 2010)

Além dos desafios clínicos, o tratamento da TB-MDR/RR apresenta um grande impacto financeiro. Os custos elevados do tratamento representam uma barreira significativa, especialmente em Moçambique, devido a limitação de recursos, contribuindo para o aumento das taxas de abandono do tratamento, agravando a morbimortalidade da doença no País (Sousa *et al.*, 2020; António, 2024).

Este estudo também analisou a resistência a fármacos de segunda linha, observando uma notificação significativa de casos de tuberculose pré-extensivamente resistente e extensivamente resistente, associadas à resistência para fluoroquinolonas e glicosídeos.

No presente estudo, 19,8% isolados de MTB foram resistentes a fármacos de segunda linha. Estudos sobre resistência a fármacos de segunda linha em Moçambique são limitados. No entanto, estes achados são apoiados por um estudo conduzidos no LNRT (2011-2015), que identificou resistência mais comum em pacientes MDR/RR, com 21,7% de pré-XDR e 21,4% de XDR (Chumane *et al.*, 2018).

Diante do contexto epidemiológico de resistência de *M. tuberculosis* nos países vizinhos a Moçambique, a África do Sul registra algumas das maiores taxas de tuberculose resistente da região, com estudos em KwaZulu-Natal mostrando cerca de 15% de MDR-TB e até 3% de XDR-TB entre os pacientes internados com tuberculose (Bantubani *et al.*, 2014). Um estudo desenvolvido na Zâmbia, mostrou que a resistência à tuberculose se apresenta como um desafio crescente e identificou que 9,8% dos pacientes apresentavam tuberculose multirresistente (TB-MDR/RR), incluindo 6,5% de casos XDR-TB e 3,2% de pré-XDR-TB. Além disso, este estudo demonstrou que 25,5% dos indivíduos tinham histórico de tratamento prévio, e esses pacientes foram 40 vezes mais propensos a desenvolver formas resistentes em comparação com os nunca

tratados (Monde *et al.*, 2022). Já no Zimbábue, estudos recentes indicam que o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos da tuberculose mostraram que 65% dos isolados eram sensíveis ao fármacos usados para tratamento da TB, enquanto 35% (84/241) apresentaram resistência a pelo menos um fármaco, 21,2% dos isolados eram multirresistentes (TB-MDR/RR), 7,1% apresentavam monoresistência à RIF e 6,6% monoresistência à INH (Kangongwe *et al.*, 2024). Estes dados quando comparados aos resultados do presente estudo, evidenciam que Moçambique apresenta uma carga relativamente maior de tuberculose resistente. Estes achados reforçam a necessidade de fortalecer as políticas nacionais de vigilância, controle e mitigação da tuberculose resistente, de modo a reduzir a transmissão e melhorar o manejo dos casos no país.

A introdução de novos fármacos, como a bedaquilina, como parte dos tratamento anti-tuberculose, pelo Ministério saúde de Moçambique, na lista de medicamentos essenciais, em 2017, apresentou resultados promissores. Esses medicamentos mostraram alta eficácia no tratamento da TB resistente, aumentando as taxas de cura e reduzindo o tempo de tratamento, trazendo uma nova esperança no combate à tuberculose em Moçambique (MISAU, 2017; Bastard *et al.*, 2019). No entanto, o uso da bedaquilina deve ser realizado com cuidado pelos clínicos, respeitando concentrações e combinações específicas para prevenir o desenvolvimento de resistência. Além disso, o monitoramento microbiológico da resistência à bedaquilina deve ser contínuo e regular pelos programas de controle (Nguyen *et al.*, 2017).

A análise molecular das estirpes TB-MDR/RR revelou que 43% (34/80) apresentavam mutações simultâneas nos genes *rpoB* e *katG*, padrão também descrito em outros estudos, onde 86,6% dos casos exibiam mutações combinadas nesses genes (Isakova *et al.*, 2018). A resistência à isoniazida está geralmente associada a mutações no códon 315 do gene *katG*, responsáveis por 47–58% dos casos (Setareh *et al.*, 2009). No presente estudo, observou-se a mesma tendência, com 59% (26/44) das amostras monoresistentes a isoniazida a demonstrarem mutações no *katG* e *inhA*. Em relação às fluoroquinolonas, fármacos de segunda linha que atuam na enzima DNA gyrase, as mutações nos genes *gyrA* (mais frequentes) e *gyrB* (menos comuns) foram as principais causas de resistência (Campbell *et al.*, 2011).

7.3. Concordância entre os métodos genotípicos (MTBDRplus e MTBDRsl) e fenotípico (teste de susceptibilidade antimicrobiana)

No presente estudo os isolados de *M. tuberculosis* apresentaram 50% de concordância na testagem de drogas de primeira linha e 66,7% para drogas de segunda linha, mostrando uma certa variação na detecção de resistências à TB. Essa discrepância pode ser explicada por diferenças na sensibilidade e especificidade entre métodos genotípicos e fenotípicos (Abebe *et al.*, 2011), bem como pela heterogeneidade genética das estirpes de *M. tuberculosis* (Zignol *et al.*, 2018; WHO, 2022). No entanto, resultados diferentes foram relatados em alguns estudos, onde mostraram concordâncias gerais de cerca de 99,5% entre os testes fenotípicos e genotípicos para rifampicina e isoniazida (Aung *et al.*, 2015).

Algumas das discrepâncias que foram identificadas, foi em amostras classificadas como resistentes pelo TSA, mas sensíveis no LPA. Esse tipo de resultado pode estar relacionado à presença de mecanismos de resistência que não envolvem mutações nos alvos investigados pelo teste molecular, ou ainda a alterações em regiões genéticas não cobertas pelas sondas do ensaio. Também é possível que mutações silenciosas, sem impacto fenotípico, expliquem alguns casos em que o LPA indicou resistência ausente no TSA. (Eaton & Ware, 2015; Yakrus, 2014)

Essas diferenças ressaltam que a detecção genotípica nem sempre reflete o comportamento fenotípico da estirpe em frente aos fármacos, sendo importante a utilização combinada de ambos os métodos para uma caracterização mais precisa. Enquanto o LPA oferece rapidez e orienta decisões terapêuticas iniciais, o TSA continua sendo o padrão de referência por avaliar diretamente o crescimento bacteriano sob a ação dos medicamentos. (Heyckendorf *et al.*, 2017; Getahun *et al.*, 2022)

Dessa forma, a variação nas percentagens de concordância reforça a importância do uso combinado de métodos diagnósticos, integrando testes moleculares e avaliação fenotípica, para aumentar a precisão do diagnóstico e melhorar o controle da TB resistente (Mao *et al.*, 2025).

8. Limitações do estudo

A principal limitação incluiu o número reduzido de amostras analisadas, consequência directa das greves e paralisações que ocorreram em Moçambique durante o período da análise.

A falta de dados demográficos na base de dados, fez com que se rejeitasse o número maior de amostras ($n = 50$).

9. Conclusão

- A tuberculose resistente a fármacos afectou maioritariamente indivíduos do sexo masculino e >15 anos, com maior prevalência na província de Maputo, especialmente nos distritos de Matola e Boane;
- As estirpes de *M. tuberculosis* apresentaram resistências a primeira e segunda linha de tratamento da tuberculose, incluindo estirpes MDR, que conferem resistência à rifampicina e à isoniazida, além de estirpes Pré-XDR e XDR;
- Os métodos de *Line Probe Assay* e o Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos para tuberculose ambos apresentaram 50% de concordância na testagem de drogas de primeira linha e 66,7% para drogas de segunda linha, havendo necessidade de combinação dos dois métodos para o diagnóstico mais completo e fiável da tuberculose resistente.

10. Recomendações do estudo

- É importante investigar os casos de resistência à bedaquilina, que foi endossada recentemente pela OMS, considerando suas consequências clínicas para o tratamento da tuberculose multiresistente.
- Avaliação da possibilidade de resistência cruzada com a clofazimina, uma vez que ambos os fármacos são utilizados em regimes semelhantes.

11. Referências bibliográficas

1. Acharya, B., Acharya, A., Gautam, S., S., Ghimire, S. P., Mishra, G., Parajuli, N., Sapkota, B. (2020). Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Biology Reports*, 47:4065–4075;
2. Ahmad S, Mokaddas E, Al-Mutairi N, Eldeen HS, Mohammadi S (2016). Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Low TB Incidence Country . *PLoS ONE* 11(4): e0153563
3. Allué-Guardia A, García J. I., Torrelles J. B. (2021). Evolution of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Their Adaptation to the Human Lung Environment. *Front. Microbiol.* 12:612675.
4. Dionísia Alfredo Balate *et al.*(2022). Evaluation of the multidrug-resistant tuberculosis surveillance system in Maputo City, Mozambique in the period 2017-2018. *Pan African Medical Journal.*41(284). 10.11604
5. Barros, A. G. S. P. (2021). Tuberculose extrapulmonar e miliar: Epidemiologia e fatores de risco. Tese de mestrado integrado em medicina, Universidade de Lisboa, pp.40;
6. Costa, K. M., Tobbin, I. A., Gonçalves, G. H. P., Kucmanski, D., *et al.*(2021). Tuberculose: Uma revisão de literature. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, v.4(n.4): 16451-16466;
7. Chai, Q, Zhang, Y, Liu, C. H. (2018). *Mycobacterium tuberculosis*: An Adaptable Pathogen Associated with Multiple Human Diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 8:158
8. Gill, C. M, Dolan L, Piggott, L.M, *et al* (2021). New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe* 2022; 18: 210149;
8. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO;
9. PNCT. (2019). Manual de manejo clínico e programático da tuberculose multirresistente;
10. MISAU (2018). Relatório da avaliação conjunta do plano estratégico e operacional, do programa nacional de controlo da tuberculose 2014-2018, do plano estratégico nacional de resposta ao hiv e sida 2016-2020 e do estabelecimento da linha de base das hepatites virais em moçambique;

11. Miggiano, R., Rizzi, M., Ferraris, D. M. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis, Infection Prevention and Treatment. *Pathogens*, 9, 385;
12. Natarajan, A., Beena, P. M., Devnikar, A., Mali, S. (2020). A systemic review on tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*.
13. Nascimento, D. N., Prado, L. D., Gonçalves, K. M., *et al* (2023). Medicamento para Tuberculose em dose fixa combinada: um panorama dos fármacos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 6, n. 4, p.15780-15802;
14. Rabahi, M.F., da Silva, J.L.R., A.C.F., Tannus-Silva, D. G. S., Conde, M. B. (2016). Tratamento da tuberculose. *J Bras Pneumol*. 2017;43(5):472-486
15. Pinhata, J. M. W. (2020). Determinação do nível de resistência a isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e correlação com mutações nos genes que conferem resistência a este fármaco: katG e inhA. Tese de doutoramento, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pp.157.
16. Tassinari, E.R., Ferreira G.G., Pegoraro N.B., Nogueira, K.S. (2022). Métodos diagnósticos para tuberculose: uma revisão integrativa. *BioScience*, v.80(S1): 28-32
17. Viney K, Linh NN, Gegia M, et al (2021). New definitions of pre-extensively and extensively drug-resistant tuberculosis: update from the World Health Organization. *Eur Respir J*; 57: 2100361;
18. Weller, B. (2023). Mozambique faces alarming multidrug-resistant tuberculosis epidemic. *Medical express*, pp5
19. Zhao P, Fang F, Yu Q, Guo J, Zhang J-h, et al. (2014) Evaluation of BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to First-Line Drugs in China. *PLoS ONE* 9(9): e99659. doi: 10.1371/journal.pone.0099659.
20. Armstrong, D. (2018). Hain GenoType Line Probe Assay: Overview and Training. *MRIglobal*
21. Antonio, J.M., Pacala, D., Munyangaju, I., Benzana, I., Mutaquiha, C., Osorio, D., Jose, B., Nacarapa, E. and Zindoga, P. (2024) Assessment of the Indirect Cost of Drug Resistant Tuberculosis Treatment to Patients in a High Burden, Low Income Setting in Mozambique. *Journal of Tuberculosis Research*, 12, 91-104.

22. Bokop, C.; Faye, L.M.; Apalata, T. Analysis of Discordance between Genotypic and Phenotypic Assays for Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Healthcare Facilities in Mthatha. *Pathogens* 2023, 12, 909.
23. Bourguignon, T.; Godinez-Leon, J.A.; Gref, R. Nanosized Drug Delivery Systems to Fight Tuberculosis. *Pharmaceutics* 2023, 15, 393.
24. Brennan, P. . (2003). *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1-3), 91–97.
25. Campos, S.H (1999). *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência?
26. Chai Q, Zhang Y and Liu CH (2018). *Mycobacterium tuberculosis: An Adaptable Pathogen Associated With Multiple Human Diseases*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:158.
27. Chen, J., Boyaci, H., & Campbell, E. A. (2020). *Diverse and unified mechanisms of transcription initiation in bacteria*. *Nature Reviews Microbiology*. Boletim de Pneumologia sanitária- vol.7.N 1
28. Janet L. Eaton, J.L, Ware A.A.(2015). The global impact of the emergence of multidrugresistant. Research Gate. RG.2.2.17381.27368
29. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2022. Stockholm: ECDC; 2023
30. Gong, W. e Wu, X. (2021) Differential Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection and Active Tuberculosis: A Key to a Successful Tuberculosis Control Strategy. *Front. Microbiol.* 12:745592
31. Isakova, J., Sovkhozova, N., Vinnikov, D., Goncharova, Z., Talaibekova, E., Aldasheva, N., & Aldashev, A. (2018). *Mutations of rpoB, katG, inhA and ahp genes in rifampicin and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in Kyrgyz Republic*. *BMC Microbiology*, 18(1).
32. Keshavjee, S., & Farmer, P. E. (2012). *Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern Medicine*. *New England Journal of Medicine*, 367(10), 931–936.
33. Kidenya, B. R., Mshana, S. E., Fitzgerald, D. W., & Ocheretina, O. (2018). Genotypic drug resistance using whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from North-western Tanzania. *Tuberculosis*, 109, 97–101.

34. Kiepiela, P., Bishop, K. S., Smith, A. N., Roux, L., & York, D. F. (2000). *Genomic mutations in the katG, inhA and aphC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Kwazulu Natal, South Africa*. Tubercle and Lung Disease, 80(1), 47–56.
35. Larachi, H., Ouadah N., MokkaDEM K. *et al*(2024). *Analysis of predictive factors for adverse effects of antituberculosis treatments*. Batna journal of medical sciences 2024, vol. 11, no. 4, 447–453
36. Line probe assays for detection of drug-resistant tuberculosis: interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians. Geneva: World Health Organization; 2022
37. Ninan, M. M., Gowri, M., Christopher, D. J., Rupali, P., & Michael, J. S. (2016). *The diagnostic utility of line probe assays for multidrug-resistant tuberculosis*. Pathogens and Global Health, 110(4-5), 194–199.
38. O fundo global(2017). Resumo técnico Tuberculose, Género e Direitos Humanos. Genebra, suíça
39. Pacheco, S. M. C. (2017). Estudo da resistência a isoniazida em Mycobacterium tuberculosis: uma caracterização estrutural e biofísica de mutações missense no gene inhA identificados a partir de isolados clínicos. [dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo]
40. Pires, G. M., Folgosa, E., Nquobile, N., Gitta, S., & Cadir, N. (2014). *Mycobacterium tuberculosis resistance to antituberculosis drugs in Mozambique*. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 40(2), 142–147.
41. Pires, G.M(2021). Análise das políticas de controle da tuberculose e do perfil epidemiológico da infecção em mocambique (2009-2017). [Dissertação de Doutorado, Universidade Nova de Lisboa].
42. Pezzella, A. T. (2019). History of Pulmonary Tuberculosis. Thoracic Surgery Clinics, Volume 29, Issue 1, 1 – 17
43. Saktiawati, A.M.I.; Vasiliu, A.; Saluzzo, F.; Akkerman, O.W. Strategies to Enhance Diagnostic Capabilities for the New Drug-Resistant Tuberculosis (DR-TB) Drugs. Pathogens 2024, 13, 1045
44. Simons SO, van Soolingen D. (2011). Drug susceptibility testing for optimizing tuberculosis treatment. Curr Pharm Des.;17(27):2863-74

45. Titosse, A., Pimenta Rodrigues, M. V., Marques Ramos, A. P., Prado Osco, L., Giuffrida, R., da Silva Fonseca, E., Azevedo Arana, A. R. (2021). Tuberculosis space-temporal distribution from 2011 to 2016 in the municipality of Maputo, Mozambique. *Población y Salud en Mesoamérica*, 18(2)
46. Tonge, P., Kisker, C., & Slayden, R. (2007). *Development of Modern InhA Inhibitors to Combat Drug Resistant Strains of Mycobacterium tuberculosis*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(5), 489–498.
47. Valencia, S., Respeito, D., Blanco, S., Ribeiro, R. M., López-Varela, E., Sequera, V. G., García-Basteiro, A. L. *et al* (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. D
48. Viegas SO, Azam K, Madeira C, et al. Mozambique's journey toward accreditation of the National Tuberculosis Reference Laboratory. *Afr J Lab Med*. 2017;6(2), a491
49. Unissa, N., A., e Hanna, L. E. (2017). *Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: Rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era*. *Tuberculosis*, 105, 96107.
50. Yadav RN, Singh BK, Sharma SK, Sharma R, Soneja M, et al. (2013). *Comparative Evaluation of GenoType MTBDRplus Line Probe Assay with Solid Culture Method in Early Diagnosis of Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) at a Tertiary Care Centre in India*. *PLoS ONE* 8(9): e72036.
51. Yusoof K. A, Garcia J. I, Schami A. , Garcia-Vilanova A. et al (2022) Tuberculosis Phenotypic and Genotypic Drug Susceptibility Testing and Immunodiagnostics: A Review. *Front. Immunol.* 13:870768
52. Setareh, M., Titov, L., e Surkova, L. (2009). *High level association of mutation in katG315 with MDR and XDR clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in Belarus*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56(4), 313–325.
53. Wildner, I. M., Nogueira, C. L., Souza, B. S. (2011). Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. *Revista de patologia tropical*. Vol. 40 (3): 207-229.
54. Santos, D. P.S., Souza, D. V., Rodrigues, S., Avelar, K. E. S. (2012). *Resistência aos fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose pulmonar por Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Saúde, Vassouras*, v. 3, n. 1, p. 13-25.

55. Figueiredo, J.C. (2024). Caracterização sociodemográfica e clínico-epidemiológica da tuberculose drogaresistente no município do rio de janeiro.[Dissertacao de bacharel, Instituto de Estudos em Saúde Coletiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro]
56. Namburete, e. i., Lisboa, M, tivane I., et al. (2016). Caracterização do perfil de resistência do Mycobacterium tuberculosis isolado de pacientes da cidade de Beira, Sofala – Moçambique. Medicina (Ribeirão Preto), 49(4):338-343
57. Macêdo, M.P.S., Melo, C.S, Cunha, B.R.P.S, et al (2021). Perfil epidemiológico da tuberculose em indivíduos do sexo masculino em uma área descentralizada de saúde no ceará. Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v.4, n.3, p. 11436-11446
58. Veloso, B. A.J.(2007). Descobertas simultaneas na Medicina do século XX (3ª parte)- Os primeiros tuberculostáticos . Medicine History
59. Arbex, M.A., Varella, M.C.L., Siqueira, H.R., Mello, F.A.F. (2010). Droga antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: Farmacos de segunda linha. J Bras Pneumol. 36(5):641-656
60. Barwise, K, Lind, A., Bennet, R, Martins, E.(2013). Intensifying action to address HIV and tuberculosis in mozambique's cross-border mining sector. International Journal of Health Services, V 43, nº4, pp699-719.
61. Chumane, S.D., Chongo, A.E., Cadir, N. et al.(2018). Mycobacterium tuberculosis resistance profile to second-line anti-tuberculosis drugs in Mozambique.
62. Nguyen, T.V.A., Anthony, R.M., Bañul, A, et al.(2017). Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism and prevention. Clinical Infectious Diseases. 66(10):1625-30.
63. Campbell, P.J., Morlock, G.P., Sikes, R.D., et al(2011). Molecular detection of mutations associated with first and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of mycobacterial tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol.55, No 5. p. 2032-41
64. Abebe, G., Paasch, F., Apers, L. et al (2011). Tuberculosis drug resistance testing by molecular methods: Opportunities and challenges in resource limited settings. Journal of Microbiological Methods 84 (2011): 155-160.
65. WHO(2018). Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

66. Naidoo, K., Perumal, R., Ngema, S.L., Shunmugam, L., Somboro, A.M. (2024) Rapid Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis– Opportunities and Challenges. *Pathogens* 2024
67. Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications of personalized care. *J. Antimicrob. Chemother.* 73:1138-1151
68. Palomino, J., M., Martin, A. (2014). Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics* 3, 317-340.
69. Mao, X., Wang, J., Xu, J., Xu, P., et al., (2025). Current diagnosing strategies for *Mycobacterium tuberculosis* and its drug resistance: a review, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 136, Issue 5.
70. Berrut, S., Richmond, P. & Roehner, B. M. (2018). *Excess-tuberculosis-mortality in young women: high accuracy exploration. Physica A*, 506, 476-485;
71. Laboratório Nacional de referência da tuberculose (2024). Inoculação para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por exame cultural em meio líquido (BACTEC MGIT 960);
72. Laboratório Nacional de referência da tuberculose (2024). Inoculação para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por exame cultural em meio sólido (Löwenstein-Jensen);
73. Laboratório Nacional de referência da tuberculose (2025). Descontaminação de micobactérias pelo método de NALC-NaOH-Citrato;
74. A verdade. Inaugurado laboratório de referência da tuberculose. Maputo: A Verdade; 27 jan. 2011. Disponível em: <https://verdade.co.mz/inaugurado-laboratorio-de-referencia-da-tuberculose/>. Acesso em: 1 nov. 2025.
75. Bantubani N, Kabera G, Connolly C, Rustonjee R, Reddy T, Cohen T, Pym AS (2014). High rates of potentially infectious tuberculosis and multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) among hospital inpatients in KwaZulu Natal, South Africa indicate risk of nosocomial transmission. *PLoS One*. 13;9(3):e90868.
76. Monde, N.; Munyeme, M.; Chongwe, G.; Wensman, J.J.; Zulu, M.; Siziya, S.; Tembo, R.; Siame, K.K.; Shambaba, O.; Malama, S. (2023). First and Second-Line Anti-Tuberculosis Drug-Resistance Patterns in Pulmonary Tuberculosis Patients in Zambia. *Antibiotics*, 12, 166

77. Kangongwe, M. H., Mwanza, W., Mwamba, M., Mwenya, J., Muzyamba, J., Mzyece, J., Hamukale, A., Tembo, E., Nsama, D., Chimzizi, R., Mubanga, A., Tambatamba, B., Mudenda, S., & Lishimpi, K. (2024). Drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by genotype MTBDRplus line probe assay in Zambia: findings and implications. *JAC - Antimicrobial Resistance*, 6(4), dlae122;
78. Wu X, Gao R, Shen X, Guo Y, Yang J, Wu Z, Tan G, Wang H, Yu F.(2020). Use of whole-genome sequencing to predict *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Shanghai, China. *Int J Infect Dis*.96:48-53;
79. Aung WW, Ei PW, Nyunt WW, Swe TL, Lwin T, Htwe MM, Kim KJ, Lee JS, Kim CK, Cho SN, Song SD, Chang CL.(2015). Phenotypic and genotypic analysis of anti-tuberculosis drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar. *Ann Lab Med*. 35(5):494-9;
80. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, Olaru ID, Schön T, Sturegård E, Beckert P, Schleusener V, Kohl TA, Hillemann D, Moradigaravand D, Parkhill J, Peacock SJ, Niemann S, Lange C, Merker M. (2018). What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on therapy for multi- and extensively drug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01550-17;
81. Getahun M, Ameni G, Mollalign H, Diriba G, Beyene D. (2022). Genotypic and phenotypic drug-resistance detection and prevalence of heteroresistance in patients with isoniazid- and multidrug-resistant tuberculosis in Ethiopia. *IJID Reg*.2;2:149-153.

Anexo 1. Aprovação pela comissão científica da Faculdade de Ciências



FACULDADE DE CIÊNCIAS
Departamento de Ciências Biológicas

Ao
Presidente do Conselho da Revisão Científica
Comité Institucional de Bioética para a Saúde
Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo
Maputo

N./Ref. 2.12/04/DCB/FC

15 de Abril de 2025

ASSUNTO: *Carta de cobertura institucional*

Para o efeito de pedido de aprovação ética do projecto de pesquisa do Trabalho de Culminação de Estudos pelo Comité Institucional de Bioética para a Saúde, Faculdade de Medicina/Hospital Central de Maputo, declara-se que **Melanie Jorge Mascarenhas Cossa** é estudante n.º 20211215 do curso de Licenciatura em Biologia Aplicada no Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Faculdade de Ciências da Universidade Eduardo Mondlane.

A estudante em referência, tem como projecto de pesquisa do Trabalho de Culminação de Estudos intitulado: **“Perfil de Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* em Amostras Referenciadas ao Laboratório Nacional de Referencia da Tuberculose no período de Janeiro de 2023 a Dezembro de 2024”**, o tema do estudante acima referida, foi APROVADO pela comissão Científica do Departamento de Ciências Biológicas, FC-UEM, com a supervisão do Prof. Doutor José João Sumbana, docente Universitário neste Departamento.

Desta forma, considera-se que o projecto reúne as condições mínimas para a sua submissão ao Comité de Bioética em Pesquisa da Faculdade de Medicina, Universidade Eduardo Mondlane (CIBS).

Com os melhores cumprimentos

A Chefes do Departamento
Doutora Iris Victorino
(Assistente)

Av. Julius Nyerere, n.º 3453, Campus Principal, C. Postal 257, Tel.: (+258) 21493377, Fax: (+258) 21493377,