UNIVERSIDADE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

EVANGELINA INÁCIO NAMBURETE

**Diversidade genômica das cepas de *Mycobacterium*
tuberculosis da região centro de Moçambique**

Ribeirão Preto

2019

EVANGELINA INÁCIO NAMBURETE

Diversidade genômica das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* da região centro de Moçambique

Versão corrigida.

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção de **Título de Doutor** em Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Valdes Roberto Bollela

RIBEIRÃO PRETO

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que, citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Namburete, Evangelina Inácio

Diversidade genômica das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* da região centro de Moçambique. Ribeirão Preto, 2019.

79 p. : il.: 30 cm.

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Bollela, Valdes Roberto

1. *Mycobacterium tuberculosis*, 2. Sequenciamento genômico, 3. Filogenia, 4. Resistência as drogas, 5. Moçambique.

FICHA DE APROVAÇÃO

Evangelina Inácio Namburete

Diversidade genômica das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* da região centro de Moçambique.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas, Programa de Clínica Médica

Aprovado em ____/____/____2019____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Martinez

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Antônio Ruffino Neto

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Gilberto Gambero Gaspar

Instituição: FM- Barão de Mauá Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Inácio Namburete Dzombola (sempre presente), meu amigo, meu confidente, o exemplo de vida, e agora meu anjo da guarda que me guia, me acompanha e me protege incondicionalmente. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nesta caminhada. Onde quer que esteja, devo a ti tudo o que eu sou hoje. Estou feliz e sou eternamente grata por ser a sua continuidade.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor... Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e pela sabedoria em todos os momentos ímpares da minha vida.

À minha origem, **Inácio Namburete e Amélia Notiço**, que, com amor, exemplo de vida e conduta humana, construiu a minha vida.

Ao **Ivandro Bauaze**, pelo amor, carinho e cumplicidade em todos os momentos desta caminhada e por ter aceitado a solidão para acomodar minhas viagens enquanto eu escrevia a tese. À **Nilza**, desculpa pelas constantes ausências.

Aos **meus irmãos**, especialmente à **Maria, Caetano, Mário, Aníbal e Ivone** e aos meus sobrinhos. Vocês estão sempre presentes na minha memória.

Ao **Prof. Dr. Valdes Roberto Bollela**, por ter sido um verdadeiro “mestre” na orientação deste trabalho. Ensinou-me os caminhos da pesquisa científica. Agradeço pela confiança, competência, disponibilidade e pelos ensinamentos acadêmico e pessoal. A você todo o meu respeito e admiração.

Ao **Dr. Lee Harrison, Dr. Ferro e Dr. Fernando Vilar**, pela confiança e incentivo.

Ao **Dr. Bernard Jan Groosjohan** (*in memoriam*) e Magnífico Reitor **Prof. Dr Pe. Alberto Ferreira** da UCM, pelo “Sim” a minha matrícula no curso de Doutorado.

Às **minhas colegas, Dra. Mara Ribeiro e Domitila Ferreira**, pelo apoio na coleta de dados no HCB, sei o quão foi trabalhoso conciliar vosso estágio clínico e fazer a coleta de dados da pesquisa.

À **minha amiga, Amélia Gove**, por estar sempre ao meu lado. Sem você eu não sou nada. À minha amiga, **Sarifa Mulina**, pelo apoio incondicional na minha carreira.

À **Equipe do Laboratório de Tuberculose no HCB**, Laboratório Nacional de Referência de TB – INS, ao CIOB e ao **Dr Ivan Manhiça** – PNCT, MISAU e à **Dra. Sofia**.

À **Dra. Cinara e à Margarida Passeri e Emilyn Costa**, pela disponibilidade imediata e trabalho de boa qualidade.

À **Dra. Anzaan Dippennar** e ao **Prof. Rob Warren**, por terem me aceitado a estagiar e pelo treinamento em análise de dados do WGS no laboratório da SMARC em Cape Town.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

NAMBURETE, E.I. **Diversidade genômica das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* da região centro de Moçambique.** 79 f. 2019. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O sequenciamento genômico total (WGS) descreve de forma abrangente a epidemiologia molecular da tuberculose (TB) através da detecção de variantes de sequência genômica, para prever os fenótipos de TB resistente às drogas (DR-TB) e, dessa forma, orientar a tomada de decisões clínicas. Identifica, ainda, linhagens e guia à vigilância da TB e permite o reconhecimento de cepas geneticamente relacionadas facilitando, assim, a compreensão de cadeias de transmissão, permitindo direcionar os esforços de controle da TB no mundo. Este é um dos primeiros estudos utilizando WGS, o qual descreve as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) causadoras de DR-TB na cidade da Beira, região central de Moçambique, onde a frequência da TB-DR tem aumentado nos últimos cinco anos. O objetivo deste estudo foi descrever a diversidade genética de cepas de *M. tuberculosis* causadoras de DR-TB na Beira. Um total de 35 cepas obtidas de isolados da Beira, foram avaliadas utilizando testes genotípicos de susceptibilidade (MTBDR_{plus}TM e MTBDR_sTM) e submetidos à WGS. A análise de WGS incluiu identificação de variantes, identificação de mutações de resistência às drogas, análise filogenética e investigação de relações entre as cepas com base em diferença nos *single nucleotide polymorphism* (SNP). Este foi um estudo descritivo transversal. Os 35 isolados que foram analisados pertencem a três das sete principais linhagens de *M. tuberculosis*: Linhagem 4: 25 (71,4%); Linhagem 1: 5 (14,3%) e Linhagem 2 que inclui família Beijing: 5 (14,3%). Dos 35 isolados que foram analisados pelo WGS, 32 (91,6%) apresentaram alguma resistência às drogas, sendo 1 (3,1%) XDR-TB e 5 (15,6%) cepas pré-XDR : 2 da linhagem 4 sub-linhagem 3 *Latin-American-Mediterranean* (LAM) e 1 de Lineage 2 família Beijing. Também demonstramos que algumas cepas estavam intimamente relacionadas, evidenciando três possíveis cadeias de transmissão neste grupo estudado.

Comparado aos testes moleculares utilizados, o WGS teve melhor desempenho na detecção de resistência às fluoroquinolonas. Não foi detectada nenhuma resistência à isoniazida por mutação no gene *inhA*. Na Beira, três das 7 linhagens filogenéticas de *M. tuberculosis*, são responsáveis pela epidemia de TB, especialmente a TB-DR, sendo que domina a frequência a linhagem 4.3 (LAM) conhecida por ser a linhagem mundialmente dispersa. Dado ao aumento progressivo dos casos de TB-DR notificados na Beira, cepas da família Beijing universalmente conhecidas por estarem associadas à virulência e distribuição massiva de resistência, começam a se tornar presentes nesta região do país. Sendo Beira uma cidade costeira, banhada pelo oceano Índico, considera-se óbvia a ocorrência de linhagem 1. A demonstração de cepas genética e intimamente relacionadas e obtidas no mesmo laboratório indica que o WGS tem potencial para uso na investigação da cadeia de transmissão de tuberculose na comunidade ou em ambiente hospitalar.

Palavras chaves: *Mycobacterium tuberculosis*; sequenciamento genômico; filogenia; resistência às drogas; Moçambique.

ABSTRACT

NAMBURETE, E.I. **Genetic diversity of strains of *Mycobacterium tuberculosis* from central region of Mozambique.** 79 f. 2019. Thesis (Doctoral Degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Whole genome sequencing (WGS) comprehensively describes molecular epidemiology of tuberculosis (TB) through the detection of genomic sequence variants, to predict drug-resistant TB (DR-TB) phenotypes and guide clinical decisions; identify strains, lineages and resistance mechanisms for TB surveillance; and permits the recognition of genetically related strains for the resolution of transmission chains to direct TB control efforts. As far as we know this is the first study using WGS that describes genetically related strains of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) causing DR-TB in Beira city, Mozambique where DR-TB is rising. We aim to describe genetic diversity of *M. tuberculosis* strains causing DR-TB in Beira City, Mozambique. A total of 35 strains from Beira, central region of Mozambique was evaluated with molecular genotypic drug susceptibility tests (DST) based on MTBDR*plus*TM and MTBDRsTM. WGS analysis included variant identification, drug resistance prediction, phylogenetic analysis, and investigating strain relatedness. This was a descriptive cross-sectional study. Total of 35 strains analyzed belongs to three of seven major *M. tuberculosis* lineages: Lineage 4: 25(71.4%); Lineage 1: 5(14.3%); and Lineage 2 Beijing family: 5(14.3%). Among the 35 strains, 32(91.6%) had any drug resistance detected, of these, 1 (3,1%) XDR-TB and 5 (15,6%) were pre-XDR strains, 2 of them from lineage 4.3 Latin-American Mediterranean (LAM) and 1 from Lineage 2 Beijing Family. Compared to molecular tests, WGS had better performance in detecting drug resistance to Fluoroquinolones. No mutations were detected in *inhA* gene, to confer resistance to INH. The DR-TB disease in Beira Mozambique is mainly caused by *M. tuberculosis* strains of Lineage 4.3 (LAM), Beijing family's strains are emerging *M. tuberculosis* driving DR-TB in Beira, and lineage 1 is also implicated with TB disease in the region. The occurrence of genetically related strains obtained from the same laboratory demonstrates a need to reinforce infection control practices in healthcare facilities and communities in Beira.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Drug-resistant, Whole genome sequencing; Phylogeny, Mozambique.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial das linhagens de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sensu stricto e <i>Mycobacterium africanum</i>	19
Figura 2. Distribuição das Linhagens de <i>M. tuberculosis</i> nas regiões sul e norte de Moçambique - Spoligotyping. (Viegas et al., 2010).....	25
Figura 3. Resumo das características da população estudada.....	39
Figura 4. Arvore filogenética de representação esquemática das cepas de MTBC causadoras de TB e TB MR na Beira Moçambique.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição das idades por faixa etária..... 40

Gráfico 2. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência a isoniazida..... 44

Gráfico 3. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência a rifampicina..... 45

Gráfico 4. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência a estreptomicina..... 46

Gráfico 5. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência a etambutol..... 47

Gráfico 6. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência a fluoroquinolonas..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes estudados..... 40

Tabela 2. Relação de genes que se apresentaram com mutações nos testes moleculares – MTBDR*plus*; MTBDR*sl* versus WGS e respectivo perfil de resistência..... 43

Tabela 3. Concordância de determinação de perfil de sensibilidade testes moleculares *versus* WGS..... 50

Tabela 4. Associação entre perfil de resistência identificado pelo WGS e linhagens filogenéticas das cepas..... 52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MTBC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB	Tuberculose
INE	Instituto Nacional de Estatística
INH	Isoniazida
RMP	Rifampicina
KAN	Kanamicina
AMK	Amikacina
CAP	Capreomicina
VIO	Viomicina
PZA	Pirazinamida
FQL	Fluoroquinolona
LAM	<i>Latin American Mediteranean</i>
RMP	Rifampicina
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HC	Hospital das Clínicas
HCFMRP	Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCB	Hospital Central da Beira
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
IS	Sequência de Inserção
TB-MDR	Tuberculose multidroga resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente às drogas
RR	Resistencia a rifampicina
MR	Multiresistente
USP	Universidade São Paulo
DR	Repetição Direta
DNA	Acido Desoxiribonucleico
MIRU	Unidade Repetidas Intercaladas Micobacterianas
RFLP	<i>Restriction fragment lengh polymorphism</i>
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SAMRC	South African Medical Research Council
DST	<i>Drug Susceptibility Test</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
HC	Hospital das Clínicas
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FAEPA	Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCT	Programa Nacional de Controlo de Tuberculose
MISAU	Ministério de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - história e características	18
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - Diversidade genética e distribuição geográfica	18
1.3 Técnicas de genotipagem do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.3.1 IS6110-RFLP	21
1.3.2 Spoligotyping.....	21
1.3.3 MIRU-VNTR	22
1.3.4 Rep-PCR	22
1.3.5 Whole Genome Sequencing – WGS	22
1.4 Diagnóstico da tuberculose resistente em Moçambique.....	23
1.5 Linhagens de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em Moçambique.....	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos	30
3.2.1 Caracterizar filogeneticamente as linhagens e sub-linhagens das cepas de <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> causadoras da epidemia de tuberculose em Beira, Moçambique;.....	30
3.2.2 Descrever as mutações de resistência e determinar o perfil de resistência as drogas das cepas estudadas;	30
3.2.3 Analisar a relação de proximidade (elo epidemiológico) entre as cepas através da distância entre os SNPs.	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Tipo de Estudo	32
4.2 Local do Estudo.....	32
4.3 População de Estudo.....	33
4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão	33
4.5 Tamanho da amostra	33
4.6 Obtenção dos dados	33
4.6.1 Revisão dos livros de registro e prontuários médicos.....	33
4.7 Processamento das amostras	34

4.7.1	No laboratório de TB do HCB – Obtenção das amostras e culturas	34
4.7.2	No laboratório de Microbactérias do HCFMRP-USP – Testes de Sensibilidade as Drogas (DST)	34
4.7.3	No Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto – Wole Genome Sequencing (WGS)	35
4.7.4	No Centro de Pesquisa em tuberculose da <i>South African Medical Research Council</i> (SAMRC) e <i>Stellenbosch University</i> : Análise filogenética e epidemiológica da cepas	35
4.8	Análise estatística	36
4.9	Aspectos Éticos	36
4.10	Apoio financeiro	37
5.	RESULTADOS	38
5.1	Introdução aos resultados	39
5.2	Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo	39
5.3	Perfil de Sensibilidade às drogas de primeira. Testes molecular <i>MTBDRplus</i> versus Whole genome sequencing.....	41
5.4	Perfil de sensibilidade às drogas de segunda linha. Teste molecular <i>MTBDRsL</i> versus Whole genome sequencing	41
5.5	Análise do perfil de sensibilidade combinado os dois testes moleculares <i>MTBDRplus</i> e <i>MTBDRsL</i> versus Whole Genome Sequencing	42
5.6	Mutações detectadas pelo Whole Genome Sequencing nas cepas com perfil de resistência a isoniazida.....	44
5.7	Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à rifampicina.....	45
5.8	Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência a estreptomicina.....	45
5.9	Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à etambutol.....	46
5.10	Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à pirazinamida	47
5.11	Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à fluoroquinolonas.....	47
5.12	Resultado do WGS em relação a outras mutações que possam causar resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> as drogas injetáveis de segunda linha.....	48

5.13	Perfil de resistência às drogas: testes moleculares MTBDR <i>plus</i> e MTBDR <i>sl</i> versus WGS	49
5.14	Descrição da comparação dos testes moleculares MTBDR <i>plus</i> e MTBDR <i>sl</i> com o WGS quanto a avaliação resistência à isoniazida, rifampicina, etambutol, fluoroquinolonas e drogas injetáveis de segunda linha.....	49
5.15	Linhagens filogenéticas de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolados em Beira, Moçambique.....	50
5.16	Perfil de resistência por linhagem filogenética de MTBC.....	51
5.17	Análise filogenética e epidemiológica descrevendo a relação entre as cepas com base em distância entre (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs)).....	52
6.	DISCUSSÃO.....	54
6.1	Caracterização dos pacientes que são a fonte das cepas dos isolados estudados.....	55
6.1.1	Perfil demográfico	55
6.1.2	Coinfecção pelo HIV	55
6.2	Perfil de resistência as drogas usadas no tratamento da tuberculose	56
6.2.1	Perfil de resistência a isoniazida e rifampicina	56
6.2.2	Perfil de resistência a pirazinamida, estreptomicina e etambutol.....	57
6.2.3	Perfil de resistência as drogas de segunda linha (fluoroquinolonas, drogas injetáveis de segunda linha e etionamida).....	58
6.2.4	Perfil de resistência multidroga – MDR	59
6.2.5	Perfil de resistencia extensiva – XDR	60
6.3	Discrepâncias entre testes moleculares MTBDR <i>plus</i> , MTBDR <i>sl</i> e WGS na determinação de mutações que conferem resistência as drogas	61
6.4	Comparação do perfil de resistência às drogas por linhagens filogenéticas	62
6.5	Análise filogenética e epidemiológica.....	63
6.6	Limitações do estudo	64
7.	CONCLUSÃO.....	66
8.	REFERÊNCIAS.....	68
9.	ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Mycobacterium tuberculosis* e Complexo *Mycobacterium tuberculosis* - história e características

O agente causador da tuberculose também conhecido como bacilo de Koch, existe há cerca de 150.000 anos (KAPUR, 1994) mas só foi isolado pela primeira vez com sucesso e demonstrado como o agente causador da tuberculose em 1882 por Robert Koch, um ano depois ficou universalmente conhecido como *Mycobacterium tuberculosis* (CAMBAU, 2014). Estudos posteriores, confirmaram que o bacilo de Koch pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC).

O MTBC é um clone de linhagens de micobactérias patogênicas (*fast-acid bacilli*) também denominadas “ecotypes” provenientes de um ancestral comum (SMITH et al., 2005; BANULS et al., 2015; GAGNEUX, 2013). Com exceção do *Mycobacterium canettii*, as micobactérias que compõem o MTBC são caracterizadas por apresentarem 99,9% de similaridade em seus nucleotídeos e sequências totalmente idênticas na sub-unidade 16S do RNA ribossomal mas, com diferenças em tropismo de hospedeiros, fenótipo de doença causada e patogenicidade (SMITH et al., 2005; GAGNEUX, 2013).

Apesar de serem originárias de um ancestral comum, o *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* e o *Mycobacterium africanum* são os principais agentes implicados com a tuberculose (TB) em humanos enquanto que os outros membros do MTBC adaptam-se são encontrados em uma variedade de hospedeiros. O *M. tuberculosis* é o maior responsável pela epidemia da TB e pelas formas resistentes da doença a nível mundial (GAGNEUX, 2013; BANÛLS et al., 2015).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis* - Diversidade genética e distribuição geográfica

Baseado em diversas tecnologias de genotipagem, as cepas de *M. tuberculosis* e *M. africanum*, subdividem-se em famílias e linhagens. Existe um total de sete linhagens filogenéticas conhecidas que compõem o MTBC e que ocorrem em diferentes regiões do mundo (Figura 1). Destas linhagens cinco são *M.*

tuberculosis sendo elas: linhagem 1 que ocorre no Leste de África, Filipinas e região do Oceano Índico; linhagem 2 que inclui a família Beijing no Leste da Ásia; linhagem 3 ocorre no Leste de África e Ásia Central; linhagem 4 esta é a mais amplamente distribuída a nível mundial pois encontra-se na Europa, América e África; a linhagem 7 que foi recentemente descrita na Etiópia e é restrita a este país; e por fim as duas linhagens do *M. africanum* que por razões desconhecidas ambas ocorrem restritamente na África Ocidental sendo linhagem 5 (West África 1) e linhagem 6 (West África 2) (GAGNEUX et al., 2007; FIRDESSA et al., 2013). Estas duas linhagens são responsáveis por 50% dos casos de TB em algumas partes da região ocidental da África (de JONG et al., 2010).

Figura 1. Distribuição mundial das linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* sensu stricto e *Mycobacterium africanum*.

A linhagem 2 é a mais estudada e juntamente com a linhagem 4 ganham mais destaque e uma atenção considerável dadas as suas particularidades. A Linhagem 2 incluindo a família Beijing está associada a resistência às drogas (BORRELL, 2009) e hipervirulência (PARWATI et al., 2010), enquanto que a linhagem 4 é amplamente dispersa a nível mundial (GAGNEUX, 2017).

Pela distribuição geográfica das linhagens, observa-se que na África todas as linhagens ocorrem sendo umas com maior frequência em relação às outras. Alguns estudos mostram que cepas de *M. tuberculosis* foram reintroduzidas na África durante a colonização e também pelas rotas comerciais (BRUDEY, 2006;

BRYNILDSRUD et al., 2018). Este fato sustenta a possível semelhança na frequência de linhagens de cepas de *M. tuberculosis* entre os países colonizadores e suas ex-colônias.

Em Moçambique, a linhagem 4 também conhecida como Europeia-Americana mas que também ocorre na África, especificamente a sublinhagem 4.3 conhecida como Latino-Americana-Mediterrânea (LAM) foi encontrada com frequência significativa (37%) por VIEGAS et al. (2010) nas regiões norte e sul do de Moçambique . CHIHOTA et al 2018 em um estudo de distribuição geoespacial de cepas de *M. tuberculosis* em África também evidenciou que LAM é a sublinhagem predominante no país visto que evidenciou-se com frequência de 30%. Este mesmo estudo sublinha que a epidemia da TB na África é uma epidemia regional, guiada por linhagens de cepas geneticamente distintas que podem ter sido reintroduzidas vindas da Europa e Ásia durante pastoralismo, comércio e guerras.

A genotipagem do *M. tuberculosis* e o conhecimento da distribuição geográfica das linhagens das cepas causadoras da epidemia da TB incluindo a TB multirresistente são ferramentas chaves da epidemiologia molecular da tuberculose. Sabe-se que, a caracterização da epidemia da TB é a base para o sucesso no desenvolvimento futuro de novas vacinas para a prevenção da doença e no desenvolvimento e fabricação de novos fármacos para o tratamento da TB.

As diversas técnicas de genotipagem do *M. tuberculosis* atualmente disponíveis, permitiram melhor descrição e caracterização das linhagens e famílias do *M. tuberculosis*.

1.3 Técnicas de genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis*

O isolamento em 1905 e a posterior publicação da sequência completa do genoma do *M. tuberculosis*, conhecida como cepa H37Rv, (COLE et al., 1998) revolucionou o conhecimento da tuberculose e permitiu melhor descrição da epidemia da TB no mundo através da caracterização e descrição molecular. Desde a década de 1990, que a genotipagem do *M. tuberculosis* tem sido usada na

epidemiologia molecular.

A genotipagem do *M. tuberculosis* tem três objetivos principais: O primeiro “clássico” é a descrição da epidemiologia molecular da TB, o segundo é a descrição da filogenética e evolução do *M. tuberculosis* e por último facilitar o manejo clínico dos casos através da classificação das cepas no que diz respeito ao perfil de susceptibilidade do bacilo as drogas. No entanto, nem todas as técnicas disponíveis são perfeitas para alcançar os três objetivos preconizados. Estudos clássicos de epidemiologia molecular da TB envolvem avaliação da transmissão da doença, diferenciação entre recaída e reinfeção ou contaminação cruzada (Kato-Maeda et al., 2011). Estes estudos requerem ferramentas e técnicas de genotipagem com alto poder discriminatório. Atualmente, diversas técnicas de genotipagem do *M. tuberculosis* estão disponíveis entre elas: IS6110-RFLP, Spoligotyping, MIRU-VNTR, Rep-PCR e WGS.

1.3.1 IS6110-RFLP

Esta técnica utiliza sequencias de inserção (IS) no genoma do *M. tuberculosis* como a IS6110. Identifica a cepa com base no número e posição genômica das IS (THIERRY et al., 1990). Constitui a primeira técnica descrita e foi utilizada durante muito tempo para a genotipagem do *M. tuberculosis*. A desvantagem desta técnica é o baixo poder discriminatório em cepas com cópias de IS6110 menor ou igual a cinco (EI et al, 2016).

1.3.2 Spoligotyping

Esta técnica identifica as cepas com base na variabilidade das regiões de repetição direta (DR) presentes no genoma do *M. tuberculosis*. É a técnica mais usada e mais simples pois tem boa relação de custo efetividade, no entanto tem baixo poder discriminativo em relação à IS6110-RFLP (van der ZANDEN et al., 2002).

Esta técnica foi usada como usada como padrão ouro de 1992 até o surgimento e a disponibilidade do sequenciamento do genoma total.

1.3.3 MIRU-VNTR

É um método automatizado que sequencia unidades repetidas e intercaladas de micobactérias (MIRU) em 12 loci diferentes de DNA microssatélite no genoma do *M. tuberculosis*. É útil para análise de muitos dados e para estudos epidemiológicos globais (FROTHINGHAM, 1998; SUPPLY, et al., 2001).

1.3.4 Rep-PCR

É um dos métodos baseados na amplificação por PCR nos quais os fragmentos espaçadores situados entre os motivos de repetição do genoma são amplificados. É um método rápido, com alto poder discriminatório e pode ser usado para amostras que não são tipificadas pelo RFLP devido ao baixo número de cópias das sequencias de inserção (EI et al., 2016). Combinado com MIRU-VNTR, o rep-PCR pode substituir o RFLP como padrão ouro especialmente em regiões com elevada prevalência de cepas da família Beijing (EI et al, 2016).

1.3.5 Whole Genome Sequencing – WGS

No século XXI tornou-se disponível esta técnica de sequenciamento do genoma total do *M. tuberculosis*, fato que revolucionou a epidemiologia molecular da TB.

Com a queda dos custos, esta técnica que é rápida e tem altíssimo poder discriminatório na identificação das cepas, resistência às drogas e tipagem filogenética, tornou-se o padrão ouro para genotipagem do *M. tuberculosis*. Ela também provê uma completa descrição da diversidade genética das cepas, permitindo desta forma melhor compreensão da transmissão da doença e guiar o tratamento (ROETZER et al., 2013; KATO-MAEDA et al., 2013; van SOOLINGEN, 2014).

Do ponto de vista de saúde pública, o WGS permite a identificação de linhagens das cepas e mecanismos de resistência das drogas. Estes são dois factos muito importantes para facilitar vigilância da TB, por outro lado o reconhecimento de cepas geneticamente relacionadas é outro fato que permite melhor compreensão das cadeias de transmissão, fator chave para direccionar os esforços de controle da TB no mundo (KATO-MAEDA et al., 2013; EI PW et al., 2016).

Sob o ponto de vista de clínico, o WGS permite com acurácia e rapidez a descrição de variantes de sequências genômicas (mutações de resistência) facilitando assim prever os fenótipos das formas resistentes da TB, permitindo desta maneira melhor orientação nas decisões clínicas relativas ao tratamento da doença e seguimento dos casos (PAPAVENTSIS et al., 2017; TAKIFF, 2015; EI PW et al., 2016).

Apesar das vantagens do WGS, o elevado custo desta tecnologia ainda faz com que ela seja indisponível em países com poucos recursos e alta carga de TB, onde as formas resistentes da doença têm muito destaque e importância, como é o caso de Moçambique.

Sabe-se que alguns casos de TB-DR ocorrem por resistência primária ou seja as pessoas infectam-se por bacilos que já são resistentes as drogas.

Em Moçambique, país com alta carga da TB onde segundo dados da OMS, a estimava de 2017 era de uma incidência de 551 casos por 100.000 habitantes mas, foram notificados no período 86.515 casos de TB e um cumulativo de 1206 casos de TB multiresistente (MR) sendo 907 TB-MDR/RR e 31 casos TB-XDR (WHO, 2018; MISAU-PNCT. Relatório Anual, 2019).

Estes dados indicam que a TB continua sendo sub-diagnosticada e sub-notificada e conseqüentemente não tratada perpetuando assim a transmissão da doença. Mais grave ainda é o fato da TB-DR ainda mais sub-diagnosticada, o que agrava ainda mais a situação epidemiológica do país. O uso do WGS no laboratório nacional de referencia de TB de Moçambique facilitaria o diagnóstico precoce através da identificação precoce das mutações de resistência, antes mesmo da expressão fenotípica das formas resistentes da doença, assim como o delineamento de estratégias apropriadas para o controle da epidemia local da TB.

1.4 Diagnóstico da tuberculose resistente em Moçambique

Dados do ministério da saúde indicam que no ano 2017 o país diagnosticou e notificou um cumulativo de 907 casos de TB multirresistente. Destes, apenas 209 foram testados para resistência as drogas de segunda linha do tratamento de TB onde 31 foram positivos confirmados que são casos de TB XDR (WHO, 2018). Estes

números reduzidos ocorrem devido a indisponibilidade de meios de diagnóstico para o rastreamento de resistência em todos os casos suspeitos.

Em Moçambique o diagnóstico da resistência as drogas de primeira linha para o tratamento da TB é feito usando a três tecnologia sendo elas: Xpert-MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), esta que para além de confirmar a presença do *M. tuberculosis*, detecta resistência a rifampicina (RR) e obedecendo a orientação da OMS, todos os casos com RR são tratados como MDR; o teste fenotípico MGIT-960 SIRE kit (MGIT- 960; Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) que avalia sensibilidade a Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol e o teste molecular *Genotype® MTBDRplus* que avalia sensibilidade a rifampicina pelo rastreio de mutações no gene *rpoB* e isoniazida pelo rastreio nos genes *katG* e *inhA* promotor. Esta última tecnologia, apenas está disponível em dois laboratórios do país. Enquanto que para o diagnóstico de resistência às drogas de segunda linha, utiliza-se o teste molecular *Genotype® MTBDRsl* que avalia sensibilidade a fluoroquinolonas (levofloxacina e ofloxacina) pelo rastreio no gene *gyrA*, drogas injetáveis de segunda linha (amicacina, kanamicina e capreomicina) rastreio nos genes *rrs* e *eis* e ao etambutol gene *embB*.

WGS ainda não está disponível no país mesmo para casos de investigação de epidemiologia molecular da TB. Na literatura, atualmente existe apenas um estudo prévio que analisou isolado de *M. tuberculosis* de Moçambique usando WGS (FELICIANO, et al., 2018). O mesmo estudo analisou mutações associadas a resistência as droga e fez descrição das linhagens filogenéticas das cepas.

1.5 Linhagens de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* em Moçambique

Existe pouca informação em relação a epidemiologia molecular da TB em Moçambique. Viegas et al. (2010), usando a técnica *Spoligotyping* fez a descrição das linhagens causadoras de TB usando isolados da região sul e norte do país, tendo demonstrado a predominância e frequência de: L4, L1 e L2 (Figura 2). Saifodine et al. (2016), usando a técnica MIRU-VNTR descreveu cepas dos isolados obtidos na cidade da Beira e evidenciou presença de: L1 e L4.

Até onde sabemos, o nosso estudo foi o primeiro que utilizou o WGS na

descrição e análise da relação entre as cepas das linhagens causadoras da TB e especificamente TB resistente em Moçambique.

Figura 2. Distribuição das Linhagens de *M. tuberculosis* nas regiões sul e norte de Moçambique - Spoligotyping. (Viegas et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O sequenciamento genômico total do *M. tuberculosis* e não apenas de fragmentos de sequências conhecidas, permite a descrição da epidemiologia molecular e adicionalmente a determinação da taxa de mutações; da resistência as drogas; descrição de alvos de novas drogas e evolução filogenética das cepas de *M. tuberculosis* (OCHERETINA, 2015; TAKIFF et al., 2015).

Moçambique, apesar de ser um dos 30 países com alta carga de TB no mundo e com tendência crescente de TB-DR, tem um enorme déficit de estudos que descrevem a epidemiologia molecular e a diversidade genética das cepas de *M. tuberculosis* causadora da epidemia local, em especial da TB-DR na região centro do país, local onde a frequência de casos de TB-DR vem aumentando progressivamente nos últimos cinco anos (MISAU. Relatório Anual, 2019).

Um estudo feito por Viegas et al., 2010 em Moçambique, usando a técnica de Spoligotyping evidenciou a linhagem 2 família Beijing como sendo uma das que ocorre com certa frequência nas regiões sul e norte do país. Porém, este mesmo estudo não analisou isolados da região centro de Moçambique e não fez o sequenciamento genômico total (VIEGAS et al., 2010).

Outro estudo feito por Saifodine et al., 2014 na Beira-Moçambique analisado dados de pacientes com TB no geral, que também sequenciou fragmentos conhecidos, usando PCR em tempo real e MIRU-VNTR evidenciou frequência das linhagens 1 e 4 (SAIFODINE et al., 2014), porém não houve frequência de cepas com mutações que causem TB-DR.

A cidade da Beira é uma das regiões do país com uma frequência elevada de TB-DR. O nosso estudo prévio que avaliou perfil de resistência as drogas de primeira e segunda linha usando os testes genotípicos e moleculares (MTBDRplus e MTBDRsL v1.0), revelou uma frequência de 16% de Tuberculose Multidroga resistente (NAMBURETE et al., 2016).

O conhecimento da epidemiologia molecular e caracterização das linhagens das cepas de *M. tuberculosis* causadoras da epidemia local da TB-DR na Beira Moçambique, tem um papel fundamental no delineamento de estratégias locais de

controle de infecção com vista a contribuir para alcançar as metas da estratégia “*End TB*”.

Portanto, usando a tecnologia WGS e não apenas o sequenciamento de fragmentos conhecidos, o nosso estudo avaliou em um estudo piloto o papel desta tecnologia na caracterização epidemiológica, molecular e de perfil de susceptibilidade a drogas das cepas de *M. tuberculosis* que causam TB-DR na cidade da Beira.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterização das cepas de *M. tuberculosis* causadoras de tuberculose resistente a drogas na cidade da Beira, Moçambique, usando a técnica de sequenciamento total do genoma.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Caracterizar filogeneticamente as linhagens e sub-linhagens das cepas de *M. tuberculosis* causadoras da epidemia de tuberculose em Beira, Moçambique;
- 3.2.2 Descrever as mutações de resistência e determinar o perfil de resistência as drogas das cepas estudadas;
- 3.2.3 Analisar a relação de proximidade (elo epidemiológico) entre as cepas através da distância entre os SNPs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Este é um estudo descritivo feito de forma transversal, que analisou isolados de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos entre janeiro de 2014 a março de 2015, de pacientes atendidos na cidade em Moçambique.

4.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado em quatro etapas, sendo que a primeira foi a coleta das amostras foi realizada no Laboratório de Referência de Tuberculose do Hospital Central da Beira, Moçambique. A segunda etapa que foi o processamento das amostras que incluiu o subcultivo dos isolados e a extração do DNA, ocorreu no Laboratório de Micobactérias do HC-FMRP-USP. A terceira etapa que foi o sequenciamento dos genomas aconteceu no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Brazil. Por último a quarta etapa que foi a análise e interpretação dos resultados aconteceu no Laboratório de Bioinformática do Centro de Pesquisa de Tuberculose da *South African Medical Council (SAMRC)* e *Stellenbosch University – Cape Town*, África do Sul.

Caracterizamos apenas o Laboratório de TB do Hospital Central da Beira, uma vez que este foi o local de coleta das amostras contendo os isolados.

Este laboratório, localiza-se na cidade da Beira, província de Sofala, Moçambique, ate o ano 2015, servia de referência para as províncias de Tete e Manica, assim como para todos os distritos da província de Sofala, incluindo a cidade da Beira. Por ser referência regional, recebia e processava anualmente cerca de 6.100 baciloscopias, 2.600 Xpert RIF/TB, 2.700 culturas automatizadas e, eventualmente, fazia também teste fenotípico de sensibilidade a drogas. A maioria das amostras clínicas era proveniente dos serviços de Medicina Interna do HCB e Centros de Saúde da cidade de Beira. Amostras de pacientes com suspeita de tuberculose resistente também eram unicamente processadas neste laboratório, uma vez que era considerado o segundo laboratório nacional de referência para TB.

Um total de 155 amostras enviadas neste laboratório foram confirmadas positivas para *M. tuberculosis* pelo teste molecular Genotype MTBDR*plus*, 40 (25.8%) evidenciaram alguma resistência as drogas de primeira linha no tratamento da tuberculose. Destes, 35 genomas correspondentes a igual número de isolados, cepas e pacientes foram caracterizados e analisados neste estudo.

4.3 População de Estudo

Foram aqui estudadas amostras de pacientes que tiveram cultura positiva para *M. tuberculosis* em meio líquido (MGIT) no Laboratório de Tuberculose do Hospital Central da Beira (HCB), no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos neste estudo pacientes de qualquer idade, com diagnóstico de tuberculose, confirmada através da detecção de *M. tuberculosis* no Genotype MTBDR*plus*, que estivessem em seguimento em serviços que tivessem como referência para investigar tuberculose o laboratório de TB do HCB, no período em que decorria o nosso estudo.

Foram excluídos pacientes com tuberculose em que nas suas amostras o *M. tuberculosis* não foi detectado na fita Hain pelo Genotype MTBDR*plus*.

4.5 Tamanho da amostra

Foi feita amostragem por conveniência onde foram selecionadas 45 isolados *M. tuberculosis* obtidos no período em estudo.

4.6 Obtenção dos dados

4.6.1 Revisão dos livros de registro e prontuários médicos

Foi feita a revisão dos prontuários médicos e dos livros de registro de casos de tuberculose e tuberculose multirresistente para a obtenção de informações sobre dados demográficos (idade, sexo); sorologia do HIV.

4.7 Processamento das amostras

4.7.1 No laboratório de TB do HCB – Obtenção das amostras e culturas

Os isolados foram obtidos no laboratório de TB do HCB. Foi feito o exame direto após coloração de Auramina O e incubação em meio de cultura líquida no sistema automatizado MGIT 960®. A identificação do complexo *M. tuberculosis* foi realizada por meio do teste imunocromatográfico rápido TB Ag MPT64 TEST BIOEASY (SD Bioline, Standard Diagnostics, Suwon, South Korea) diretamente do meio de cultura líquido, conforme instruções do fabricante. Este teste fazia parte da rotina do laboratório de TB do HCB. A confirmação do *M. tuberculosis*, feita utilizando o Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience, GmbH, Germany) este é um teste molecular endossado pela Organização Mundial da Saúde e utilizado para o diagnóstico da tuberculose e da resistência a isoniazida e rifampicina (WHO, 2008). As amostras foram transportadas para o laboratório de microbactérias do HCFMRP-USP, Brasil.

4.7.2 No laboratório de Microbactérias do HCFMRP-USP – Testes de Sensibilidade as Drogas (DST)

Os isolados foram subcultivados em meio de cultura líquido no sistema automatizado MGIT 960® e analisadas pelo teste de Sensibilidade às Drogas (DST) genotípico, com intuito de confirmar a presença de *M. tuberculosis* e identificar resistência às drogas de primeira linha e segunda linha de tratamento da tuberculose.

Os testes moleculares foram realizados utilizando o Genotype-MTBDRplus 2.0 e o MTBDRsl 2.0 (Hain Lifesciences, GmbH, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O MTBDRplus avalia mutações no *rpoB* (resistência RMP); genes *katG* e *inhA* (resistência INH) (HAIN LIFESCIENCE, 2012), enquanto o MTBDRsl detecta mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* (resistência a fluorquinolonas); e mutações genes *rrs* e *eis* que indicam resistência as drogas injetáveis de segunda linha como capreomicina, amikacina e kanamicina (HAIN LIFESCIENCE, 2015).

A extração e purificação do DNA do genoma dos isolados de *M. tuberculosis* sub cultivados foi feita usando o método de lizozima de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (LARSEN et al., 2007). As concentrações de ADN foram medidas utilizando Nanodrop e depois verificadas por eletroforese em gel de agarose .

4.7.3 No Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto – Wole Genome Sequencing (WGS)

O WGS foi feito usando o sistema Illumina MiSeq Sequencing System MiSeqV2-500 (Illumina, San Diego, CA, EUA). A biblioteca de DNA foi preparada usando o kit de preparação da biblioteca Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EUA). As sequencias foram obtidas usando o kit de reagentes MiSeq Sequencer V2, conforme o protocolo do fabricante (Illumina, San Diego, CA, EUA) (ILUMINA NEXTERA®), produzindo sequencias 2 × 250, com um comprimento de leitura de 500bp. As sequências do genoma completo foram depositadas no European Nucleotide Archive com número de acesso: **PRJEB32773**.

4.7.4 No Centro de Pesquisa em tuberculose da *South African Medical Research Council (SAMRC)* e *Stellenbosch University*: Análise filogenética e epidemiológica da cepas

As cepas obtidas pelo sequenciamento genômico foram analisadas e as leituras com escore de qualidade phred ≥ 20 foram mapeadas com BWA v 0.7.5a (Ferramenta de alinhamento de Burrows-Wheeler) (LI et al.,2009) usando como genoma de referência a cepa *H37Rv* de *M. tuberculosis*.

A conversão do formato do mapa de alinhamento de sequência (SAM) classificado e os arquivos de mapa de alinhamento binário (BAM) indexados foram feitos usando ferramentas SAM (versão 0.1.19) (LI et al.,2009). As sequencias duplicadas de PCR foram removidas usando a opção Mark Duplicates das ferramentas de software Picard (versão 1.61). As variantes foram identificadas com SAMtools / BCFtools v 0.1.18 e anotadas com SnpEffv 4.0.

Finalmente foi feito alinhamento tendo como genoma de referência de *M. tuberculosis* a cepa H37Rv (Genbank: AL123456.3) usando três diferentes ferramentas de alinhamento: o BWA, Novoalign (Novocraft) e SMALT (PONSTINGL, et al., 2010).

Os arquivos de alinhamento foram submetidos a realinhamento local com intuito de identificar inserções, exclusões (indels) e duplicação isto foi feito usando o Genome Analysis Toolkit (GATK) (MCKENNA, et al., 2010) e Picard Tools (WINGLEE, et al., 2016), respectivamente.

Variantes genômicas (polimorfismos de nucleotídeo único e indels) em regiões codificadoras e não-codificantes foram identificadas a partir de cada arquivo de alinhamento usando GATK (MCKENNA, et al., 2010) e SAMTools (LI et al., 2009). As variantes foram anotadas usando dados de anotação de TubercuList (LEW et al., 2011). Desta forma foram obtidas as cepas de *M. tuberculosis* de cada isolado.

Para identificar mutações conhecida por causar resistência as drogas, foi usada a ferramenta TB Profiler (COLL et al., 1998). E finalmente a construção da árvore filogenética foi feita usando a ferramenta Figtree (SAUVAGE et al., 2018).

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos através do sequenciamento genômico total foram apresentados de forma descritiva e comparados a dados disponíveis na literatura.

4.9 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Bioética para Saúde (IRB00002656) do Ministério de Saúde de Moçambique e registrado sob o número 82/CNBS/2014. Devido ao suporte financeiro foi também encaminhado ao IRB da Universidade de Pittsburgh, sendo aprovado e registado sob o número PRO14120250. Como o HCFMRP foi Instituição coparticipante, o projeto teve o parecer favorável do CEP do HC. O termo de consentimento foi dispensado, uma vez que o estudo não envolveu contato direto com pacientes.

4.10 Apoio financeiro

Este estudo teve apoio financiamento parcial do *Fogarty International Center HIV Research Training Program grant, National Institutes of Health*, to the University of Pittsburgh (D43TW009753); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo 15/13333-3 e Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (2015-2017).

5. RESULTADOS

5.1 Introdução aos resultados

Dos 45 isolados selecionados, 10 tiveram uma qualidade de DNA $\leq 20\%$ e estes foram excluídos da análise desta forma, os resultados aqui descritos são relativos a 35 cepas provenientes de igual número de pacientes (Figura 3).

Figura 3. Resumo das características da população estudada

5.2 Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo

Dos 35 pacientes, todos da província de Sofala, 23(66%) foram do sexo masculino e 12(34%) feminino (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes estudados.

DADOS DEMOGRÁFICOS		
Idade Média		35 anos
Sexo	Masculino	23 (66%)
	Feminino	12 (34%)
Raça	Negra	32 (91%)
	Ignorada	03 (9%)

A idade média foi de 35 anos com mínima de 17 e máxima de 65 anos (Gráfico 1). Todos os 35 pacientes tinham tuberculose pulmonar e o espécimen foi o escarro. Dos 35 pacientes, 21 (60%) tinham a sorologia conhecida para o HIV, desses 12(57%) estavam coinfectados pelo HIV (Figura 3).

Gráfico 1. Distribuição das idades por faixa etária

5.3 Perfil de Sensibilidade às drogas de primeira. Testes molecular MTBDRplus versus Whole genome sequencing

Pelos testes genotípicos MTBDRplus e pelo WGS, a resistência a isoniazida devido a mutação no gene *katG* foi detectada em 26/35(74.2%) versus 28/35(80.0%); ambos testes não detectaram mutação na região do promotor do gene *inhA*; resistência a rifampicina por mutação no gene *rpoB* detectou-se em 23/35(65.7%) versus 23/35(65.7%) por fim a resistência simultânea a isoniazida e rifampicina indicando ocorrência de TB-MDR foi detectada em 16/35(45.7%) versus 16/35(45.7%) Tabela 2.

5.4 Perfil de sensibilidade às drogas de segunda linha. Teste molecular MTBDRsL versus Whole genome sequencing

Analisando a resistência entre os dois testes, observou-se o seguinte: resistência a fluoroquinolonas por mutação no gene *gyrA* ocorreu em 4/35(11.4%) versus 7/35(20.0%). Enquanto que a resistência ao etambutol por mutação no gene *embB* foi detectada em 7/35(20.0%) versus 13/35(37.1%); adicionalmente o WGS detectou mutações nos genes *embA*, *embC* este que são genes não rastreados pelo MTBDRsL. Em relação às drogas injetáveis de segunda linha, a resistência por mutação no gene *rrs* não ocorreu tanto pelo teste molecular assim como pelo WGS mas a mutação no gene *eis* o que interpreta-se como resistência de baixo nível a kanamicina, foi detectada em 1 isolado nos dos dois testes. Dada a vantagem do WGS em fazer a inspeção total do genoma, este teste permitiu a visualizar de mutações associadas a resistência as seguintes drogas: Estreptomicina, Pirazinamida, e Etionamida, fato que não é avaliado pelos testes moleculares (Tabela 2).

5.5 Análise do perfil de sensibilidade combinado os dois testes moleculares MTBDR_{plus} e MTBDR_{sL} versus Whole Genome Sequencing

Com intuito de determinar a frequência de resistência extensiva, foi efetuada uma análise conjunta dos dois testes moleculares *versus* WGS. A frequência de isolados com resistência simultânea a isoniazida, rifampicina e fluoroquinolonas, fato interpretado como sendo perfil pre-XDR, ocorreu em 4/35(11.4%)teste moleculares *versus* 5/35(14.2%) no WGS. Dos 35 avaliados, um isolado correspondente a 2.9% evidenciou resistência concomitante a isoniazida, rifampicina, fluoroquinolonas e kanamicina, completando desta forma os critérios de resistência extensiva e foi considerado ser isolado de TB-XDR. Nenhuma resistência foi detectada em 1(2.9%) e 2(5.7%) isolados pelos dois testes respetivamente e estes foram considerados como sendo isolados de *M. tuberculosis* sensível as drogas (Tabela 2).

Para todos isolados sequenciados, mais de 99% do genoma de referência foi coberto por pelo menos uma leitura com a profundidade média de cobertura de 44 (min. 6 - máx. 83) considerando a profundidade média de cobertura para cada isolado alinhado a *M. tuberculose H37Rv* com BWA, Novoalign e SMALT.

Tabela 2. Relação de genes que apresentaram-se com mutações nos testes moleculares – MTBDR_{plus}; MTBDR_s versus WGS e respetivo perfil de resistência.

ID	LPA - H_MTBDR _{plus}	H_WGS	LPA - R_MTBDR _{plus}	R_WGS	LPA - Fq_MTBDR _s	FQ_WGS	LPA - iSLD_MTBDR _s	iSLD_WGS	DR-TB_LPA	DR-TB_WGS	Concordância entre WGS & LPA: H, R, FQ, iSLD
118	katG_S315T	katG_S315T	S	S	S	S	S	S	HR	HR	1,1,1,1
141	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
205	katG_S315T	katG_S315N	S450T; H445T	S450W	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
208	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	D435Y	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
227	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
243	katG_S315T	S	S450T; H445T	S	S	S	S	S	MDR	S	2,2,1,1
316	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	H445Y	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
370	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	S	S	S	S	S	MDR	HR	1,2,1,1
509	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
581	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S450T; H445T	H445Y	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
751	katG_S315T	katG_S315T	S	V170F	S	S	S	S	HR	MDR	1,3,1,1
894	katG_S315T	katG_S315T	S	S	S	S	S	S	HR	HR	1,1,1,1
964	S	S	S450T; H445T	H445Y	S	S	S	S	RR	RR	1,1,1,1
1507	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S450T; H445T	H445Y	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
1689	katG_S315T	katG_S315T, katG_D94G, oxyR'-ahpC -52C>T	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
1728	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	S450L	A90V	A90V	S	S	Pre-XDR	Pre-XDR	1,1,1,1
1866	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	S450L	A90V	A90V	S	S	Pre-XDR	Pre-XDR	1,1,1,1
1869	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S	S	S	S	S	S	RR	RR	1,1,1,1
2065	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
2078	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S	V170F	S	S	S	S	HR	MDR	1,3,1,1
2136	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	H445Y	D90G	D94G	S	S	Pre-XDR	Pre-XDR	1,1,1,1
2235	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S450T; H445T	S441L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
2330	katG_S315T	katG_S315T, oxyR'-ahpC (-52C>T)	S	S	S	S	S	S	HR	HR	1,1,1,1
2368*	katG_S315T	katG_S315T, Rv1482c-fabG1 (-15C>T)	S450T; H445T	S450L	A90V	A90V	eis C14T	eis C14T	XDR	XDR	1,1,1,1
2422	katG_S315T	katG_S315T	S	S	S	S	S	S	HR	HR	1,1,1,1
2440	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	H445L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
2449	S	katG_S315T	S	H445L	S	S	S	S	S	MDR	3,3,1,1
2683	katG_S315T	katG_S315T	S	S	S	S	S	S	HR	HR	1,1,1,1
2721	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	H445R	S	A90V	S	S	MDR	Pre-XDR	1,1,3,1
2852	katG_S315T	katG_S315T	H445Y	S	S	A90V, D94G	S	S	MDR	H,FqR	1,1,3,1
3026	katG_S315T	S	S	S	S	S	S	S	HR	S	2,1,1,1
3033	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1
3141	S	ahpC_TSI	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	RR	MDR	3,1,1,1
3185	katG_S315T	katG_S315N	S450T; H445T	H445R	S	A90V	S	S	MDR	Pre-XDR	1,1,3,1
3376	katG_S315T	katG_S315T	S450T; H445T	S450L	S	S	S	S	MDR	MDR	1,1,1,1

* MTBDR_s detectou mutação C14T no gene *eis*, TB Profiler não detectou esta mutação mas pela revisão manual foi visualizada a mesma mutação.

- 1 Concordância entre WGS e LPA
- 2 Sensível no WGS e resistente no LPA
- 3 Sensível no LPA e resistente no WGS

S= Sensível;
H= Isoniazida;
R= Rifampicina;
FQ= Fluoroquinilona;
PZA= Pirazinamida;
EMB= Etambutol;
Sm= Streptomicina;
iSLD= Drogas injetáveis de segunda linha;
LPA= Line-probe assay;
WGS= Whole genome sequencing;
HR= resistente a isoniazida;
RR= resistente a rifampicina;
FQ= resistente a fluoroquinolonas;
MDR= multi droga resistente ;
XDR= extensivamente droga resistente.

5.6 Mutações detectadas pelo Whole Genome Sequencing nas cepas com perfil de resistência a isoniazida.

Em um total de 31 cepas que apresentaram mutações no gene *katG*, a S315T que infere resistência de alto nível a isoniazida (COLL et al., 2015) foi a mais frequente uma vez que ocorreu de forma exclusiva em 21/31(67.7%). Em 10 das 31 cepas, foram evidenciadas concomitantemente com a S315T mutações em outras partes do genoma como e o caso de *oxyR'*-*ahpC* (52C>T) que ocorreu em 9/31(29%) e *Rv1482c*-*fabG1* (-15C>T) em 1/31(3.2%) embora estas não estão associadas com resistência a isoniazida.

Sabe-se que mutações na região do promotor do gene *inhA* causam a resistência de baixo nível a isoniazida (WHO, 2008). Das cepas analisadas, nenhuma evidenciou este tipo de mutação.

Gráfico 2. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência a isoniazida.

5.7 Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à rifampicina.

Das 25 cepas com mutações no gene *rpoB*, classicamente conhecido por inferir resistência à rifampicina, a mutação S450L que ocorreu exclusivamente em 12/25(48%) foi a mais predominante, H445Y ocorreu em 5/25(20%) cepas; S450W, D435Y, S441L e H445R foram detectadas em uma cepa separadamente cada enquanto que V170F e H445L em 2/25(8%) foram evidenciadas de forma separada 2 cepas.

Gráfico 3. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência à rifampicina.

5.8 Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência a estreptomicina.

Em um total de 21 cepas que se apresentaram com mutações conhecidas por inferirem resistência a estreptomicina, a mutação mais frequente foi K43R no gene *rpsL* que ocorreu em 20/21(95.2%) enquanto que L45A no mesmo gene foi detectada em 1/21(4.8%). Não foram encontradas mutações no gene *gidB* este que

também e um gene conhecido por apresentar mutações que possam conferir resistência a estreptomicina.

Gráfico 4. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência à estreptomicina.

5.9 Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à etambutol

Um total de 18 cepas exibiram mutações que causam resistência à etambutol, a mais frequente mutação foi a ocorrência isolada de M306L no *embB* observada em 7/18(39%), no mesmo gene foram detectadas também as seguintes mutações: Q497R em 2/18(11%); *embB* D328Y em simultâneo com *embA* 11C>T em 2/18(11%), M306L em simultâneo com *embA* 16T>C em 1/18(5.5%), *embB* M306L + G406D + Q479R em 1/18(5.5%), *embB* M306L + Y384N + *embA* 16C>T em 1/18(5.5%) e por fim a ocorrência de *embA* 11C>A isoladamente em 4/18(22%).

Gráfico 5. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência ao etambutol

5.10 Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à pirazinamida

Em relação a esta droga, apenas três cepas apresentaram mutações de resistência, sendo elas R154G e ocorreu em uma cepa e L19R em duas cepas. Ambas mutações foram detectadas no gene *pncA*.

5.11 Mutações detectadas pelo WGS nas cepas com perfil de resistência à fluoroquinolonas.

Um total de sete cepas revelaram mutações que inferem resistência a fluoroquinolonas, A90V foi a mais predominante, ocorreu isoladamente em 5/7(71.4%); D94G foi detectada isoladamente em uma cepa e as duas mutações (A90V + D94G) ocorreram simultaneamente em 1 cepa Gráfico 6. Das sete cepas

com mutações de resistência a fluoroquinolonas, seis preencheram critérios de cepas Pre-XDR uma vez que também tinham mutações de resistência a isoniazida e rifampicina, uma das sete cepas completou os critérios de XDR uma vez que para além de resistência a isoniazida e rifampicina, também apresentou mutação que infere resistência de baixo nível a kanamicina (Tabela 2).

Gráfico 6. Representação esquemática da distribuição das mutações detectadas nas cepas com resistência a fluoroquinolonas.

5.12 Resultado do WGS em relação a outras mutações que possam causar resistência do *Mycobacterium tuberculosis* as drogas injetáveis de segunda linha.

Dos 35 genomas analisados, correspondentes a 35 cepas de *M. tuberculosis*, 1 apresentou mutação no gene *eis*, este tipo de mutação está associada com resistência de baixo nível a kanamicina (HAIN LIFESCIENCE, 2015). Não foi detectada nenhuma mutação de resistência a etionamida e também não foram encontradas outras mutações que inferem fenótipos de resistência outras drogas não mencionadas anteriormente e que sejam usadas para o tratamento de tuberculose.

5.13 Perfil de resistência às drogas: testes moleculares MTBDRplus e MTBDRsl versus WGS

Dos 35 isolados submetidos aos testes moleculares (MTBDRplus e MTBDRsl), 1/35(3%) não apresentou resistência as drogas testadas por isso foi classificado como sensível. 8/35(23%) evidenciaram mono resistência (mono-R) à isoniazida, e 2/35(5%) mono-R à rifampicina enquanto que 18/35 (51%) apresentaram perfil de resistência multidroga, 1/35(3%) resistência extensiva portanto, estes foram classificados como sendo isolados de TB-MDR e XDR respetivamente. Os genomas dos mesmos isolados, analisados pelos WGS apresentaram os seguintes perfis: 2/35(5.7%) sensíveis, 6/35(17%) mono-R a isoniazida, 2/35(6%) mono-R a rifampicina, 18/35(51%) MDR, 1/35(3%) XDR e 5/35(14%) pre-XDR e 1/35 (3%) resistente a estreptomicina e etambutol (Tabela 2).

Houve concordância entre testes moleculares e WGS em relação a detecção de XDR na cepa com ID 2368. Observamos discordância nos resultados em oito isolados (Tabela 1), WGS evidenciou mutações de resistência a rifampicina que não foram detectadas pelo MTBDRplus nas cepas ID 751, 2078 e 2449 e mutações de resistência a fluoroquinolonas que não foram evidenciadas pelo MTBDRsl nas cepas ID 2721 e 3185. Por outro lado, o MTBDRsl detectou mutações de resistência nas cepas 370 e 3026 e que não foram confirmadas no WGS (Tabela 2).

5.14 Descrição da comparação dos testes moleculares MTBDRplus e MTBDRsl com o WGS quanto a avaliação resistência à isoniazida, rifampicina, etambutol, fluoroquinolonas e drogas injetáveis de segunda linha

Todos os 35 isolados foram avaliados tanto pelos testes moleculares assim como pelo WGS. Usando o coeficiente Kappa, foi determinada a concordância entre os dois teste quanto a avaliação de resistência à isoniazida e rifampicina o que se traduz com diagnostico de TB-MDR, assim como resistência a fluoroquinolonas e drogas injetáveis de segunda linha, que quando interpretada concomitantemente a resistência à isoniazida e rifampicina indica diagnóstico de TB-XDR. A

concordância entre os dois testes foi de 0,75 com um intervalo de confiança 95% de 0,54 – 0,94 (Tabela 3).

Tabela 3. Concordância de determinação de perfil de sensibilidade testes moleculares *versus* WGS

MTBDRplus MTBDRsl	WGS		Total	Kappa (IC 95%)
	Resistente	Sensível		
Resistente	32 (91.4%)	2 (5.7%)	34	0,75 (0,54 -0,94)
Sensível	1(2.8%)	0 (0.0%)	1	
Total	33	2	35	

5.15 Linhagens filogenéticas de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isolados em Beira, Moçambique

As 35 cepas estudadas pertenceram a três das sete linhagens filogenéticas conhecidas do MTBC. A linhagem 4 conhecida como Europeia-Americana mas que ocorre também na África, foi a mais predominante na nossa amostra, ocorrendo em 25/35(71.4%). Destas, especificamente a sublinhagem 4.3 conhecida como Latino-Americana-Mediterrânea (LAM) foi encontrada com frequência significativa 22/25(88%), seguido da subfamília 4.9 que ocorreu em 2/25(8%) e por último a subfamília 4.1 em 1/25(4%). A linhagem 1 que ocorre no Leste de África, Filipinas e região do Oceano Indico, foi identificada em 5/35(14.3%) cepas; as outras 5/35(14.3%) cepas pertenceram à linhagem 2 subfamília Beijing, que mundialmente encontra-se mais no Leste da Ásia (Figura 4).

Figura 4. Arvore filogenética de representação esquemática das cepas de MTBC causadoras de TB e TB MR na Beira Moçambique

5.16 Perfil de resistência por linhagem filogenética de MTBC

Sabe-se que a linhagem 2 que inclui a família Beijing e altamente virulenta, está associada à distribuição massiva de resistência às drogas mundialmente (RODRIGUEZ-CATILLO et al., 2017; PARWATI et al., 2010). Na nossa pequena amostra este cenário tende a confirmar-se, das cinco cepas que pertenceram a linhagem 2, todas apresentaram alguma resistência às drogas. Destas, em uma cepa foi detectada resistência a estreptomicina e etambutol, 2 cepas evidenciaram perfil MDR e outras duas cepas apresentaram perfil Pre-XDR (Tabela 4).

A linhagem 4 que é amplamente dispersa a nível mundial e que acredita-se que tenha sido reintroduzida em África durante a colonização e também pelas rotas

comerciais (BRYNILDSRUD *et al.*, 2018), por ter ocorrido com maior frequência na nossa amostra, das 25 cepas identificadas como sendo desta linhagem, 14 apresentaram-se com perfil MDR, quatro Pre-XDR, 5 com mono-R e a única cepa XDR no nosso estudo também pertenceu a esta linhagem (Tabela 4).

Por fim, em relação as cinco cepas da linhagem 1, duas tinham o perfil MDR, duas com mono-R e uma sem mutações de resistência. Nenhuma cepa desta linhagem evidenciou perfil pre-XDR (Tabela 4). A ocorrência de TB-XDR e pre-XDR na Linhagem 1, 2 e 4 foram respectivamente (0, 60% e 20%).

Tabela 4. Associação entre perfil de resistência identificado pelo WGS e linhagens filogenéticas das cepas

Linhagem de MTBC	Mono-R	MDR	Pre-XDR	XDR	Sensível	Total
Linhagem 1	2 (25%)	2 (11%)	0 (0,0%)	0 (0.0%)	1 (50%)	5
Linhagem 2	1 (12%)	2 (11%)	2 (33%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5
Linhagem 4	5 (63%)	14(78%)	4 (67%)	1 (100%)	1 (50%)	25
Total	8 (100%)	18 (100%)	6 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	35

5.17 Análise filogenética e epidemiológica descrevendo a relação entre as cepas com base em distância entre (*Single Nucleotide Polymorphins* (SNPs))

A árvore filogenética baseada em SNPs demonstrou a associação entre os genomas de linhagens obtidas pelo WGS, spoligotyping e perfis de resistência (Tabela 2). Com base nas estimativas de divergência evolutiva entre sequências, observamos que as cepas de alguns isolados estão intimamente relacionadas isto porque estas cepas tiveram pequena distância genética (definida como 5 SNPs),

enquanto que os outros isolados mostraram maior distância genética (definida como 10 e 15 SNPs) (Figura 4).

Considerando uma diferença de até cinco, dez e quinze SNPs, observamos três possíveis cadeias de transmissão de TB nestes 35 isolados. Considerando o limite de 5 SNPs o que infere transmissão recente, observamos 10 genomas relacionados e simultaneamente tinham mutação no *katG* sugerindo assim que estes pertence a mesma cadeia de transmissão recente (Figura 4). A partir da figura, é evidente que nem todos esses isolados têm o mesmo perfil de resistência, o que pode implicar na presença endêmica de cepas com monoresistência à isoniazida, que subsequentemente desenvolvem resistência à rifampicina e, então, se espalham, como demonstrado na figura 4.

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos pacientes que são a fonte das cepas dos isolados estudados

6.1.1 Perfil demográfico

As 35 cepas estudadas, obtidas do mesmo número de isolados, tiveram como fonte pacientes com idade média de 35 anos variando de 17 a 65, com predomínio da faixa etária entre 26 e 45 anos e o gênero masculino foi mais frequente.

Estes achados justificam-se porque Moçambique é um país de população jovem, onde 50.1% da população têm entre 15 a 65 anos (INE-Senso 2017). Segundo a história natural da TB, sua manifestação ativa é comum nos adultos jovens, isto é, na idade economicamente produtiva, acometendo mais o gênero masculino (VYNNYCKY, 1997).

Um estudo de SAIFODINE et al. (2016) realizado com isolados obtidos de pacientes da Beira, obteve resultados similares aos nossos em relação a idade dos pacientes (media 32, variação 18-62 anos) e predominância do sexo masculino (64.2%). Segundo dados da OMS, nos anos 2014 a 2016, mais de 84% dos casos notificados globalmente ocorrem em adultos na idade produtiva, com maior frequência na faixa etária entre 35 a 54 anos (WHO, 2018).

6.1.2 Coinfecção pelo HIV

Moçambique aderiu a recomendação da OMS segundo a qual os programas de controlo da tuberculose e de HIV devem ter uma interligação no sentido de desenvolverem atividades colaborativas e integradas para permitir que, todos os pacientes com TB tenham sorologia do HIV conhecida e seguimento conjunto. O MISAU, através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), orientou todas as unidades sanitárias do país a cumprirem esta recomendação (MAPUTO-PNCT, 2015).

Na nossa pequena amostra de 35 pacientes, 21 (60%) tinham sorologia de HIV conhecida e destes 12(57%) estavam coinfectados. Dados de 2014 revelaram que 96% dos pacientes com TB notificados no país tinham sorologia para o HIV

conhecida 52% destes estavam coinfectados (MISAU, Relatório Anual 2015). BOS et al. (2013), na Beira, com uma amostra de 234 pacientes onde 74.8% tinham sorologia conhecida encontrou uma taxa de coinfeção de 80%. SAIFODINE et al. (2016), também na Beira, com uma amostra de 67 pacientes todos com sorologia para o HIV conhecida evidenciou uma percentagem de coinfeção de 74.5%.

Apesar das diferenças nos tamanhos amostrais entre os dois estudos feitos na Beira, dados nacionais e o nosso estudo, em todos é possível observar que a percentagem de coinfeção TB/HIV na Beira mantém-se acima de 50%, mostrando assim que Moçambique apresenta elevada prevalência da coinfeção TB/HIV. No país, a recomendação da OMS não é totalmente cumprida visto que a percentagem de pacientes com TB e sorologia para o HIV conhecida nos estudos prévios na Beira assim como no nosso estudo não atingiu 100%.

6.2 Perfil de resistência as drogas usadas no tratamento da tuberculose

6.2.1 Perfil de resistência a isoniazida e rifampicina

Dos 35 isolados avaliados pelo teste genotípico MTBDRplus assim como pelo WGS, a resistência a isoniazida devido a mutação no gene *katG* ocorreu em 74.2% versus 80.0%; ambos teste não detectaram mutação na região do promotor *inhA*; resistência a rifampicina por mutação no gene *rpoB* foi detectada em 65.7% versus 65.7% por fim a resistência simultânea a isoniazida e rifampicina indicando ocorrência de TB-MDR evidenciou-se em 45.7% versus 45.7%.

Sabe-se que WGS permite uma completa descrição do genoma das cepas identificando precocemente mutações que não são detectadas por outros testes (KATO-MAEDA et al., 2013; GARDY et al., 2011).

A mais importante aplicação clínica do WGS em relação ao *M. tuberculosis* é predizer o fenótipo da resistência as drogas anti-TB. Embora, a acurácia desta informação dependa do nosso conhecimento em relação a associação entre o fenótipo da doença e o perfil genotípico de resistência (DOMÍNGUEZ et al., 2016).

A acurácia do WGS em predizer resistência a droga também varia em diferentes classes de drogas assim como em diferentes drogas da mesma classe (CHATTERJEE et al., 2017). Quando a concentração inibitória mínima está próxima

do ponto crítico entre sensível e resistente isto pode ter impacto no valor preditivo das mutações de resistência (DOMÍNGUEZ et al., 2016; CHATTERJEE et al., 2017).

A percentagem de detecção de mutações de resistência à rifampicina foi igual entre os dois testes, mas houve discrepância em relação às cepas onde tais mutações foram detectadas.

O teste molecular MTBDRplus detectou erradamente mutações de resistência a rifampicina em três cepas, estas, mesmo quando examinadas manualmente as sequencias dos genes em causa, não foram observadas mutações. FELICIANO et al., (2018), com base na técnica WGS usando isolados da Beira, também observou que o WGS foi mais específico na detecção de resistência à rifampicina (92.3%), isoniazida (100%), quando comparado ao teste molecular MTBDRplus.

Estudos mostram que resistência a INH por mutações na região do promotor do *inhA* ocorre com menor frequência em relação à resistência por mutação no gene *katG* (CAVUSOGLU, et al., 2006; KIEPIELA et al., 2000; MAURYA et al., 2013).

Na nossa pequena amostra de 35 isolados, a resistência de baixo nível a INH devido a mutação no *inhA* promotor ou *kasA* não ocorreu. No nosso estudo prévio quando avaliamos o perfil genotípico de resistência as drogas anti-TB, em uma casuística de 38 isolados da Beira, a mutação no *inhA* promotor ocorreu com baixa frequência (10.5%) (BOLLELA et al., 2016).

Desta forma, podemos dizer que a resistência de baixo nível a INH é menos frequente na Beira portanto, protocolos de tratamento das formas resistentes de TB na Beira, usando altas doses de INH não são recomendáveis.

6.2.2 Perfil de resistência a pirazinamida, estreptomicina e etambutol

A pirazinamida (PZA) é uma droga que atua no meio intracelular em patógenos intracelulares como é o caso do *M. tuberculosis* (NUSRATH, 2017). Por este motivo e também devido a limitações dos testes fenotípicos em avaliar a resistência a esta droga, a OMS recomenda que seja mantida a PZA no tratamento dos casos de TB-DR, mesmo quando a resistência a esta droga for detectada (WHO,

2016). A resistência do *M. tuberculosis* a PZA, acontece devido a ocorrência de mutações no gene *pncA* embora, nem todas as mutações que ocorrem neste gene estejam associadas a resistência (WHO, 2018; NUSRATH, 2017). Na nossa amostra, pelo WGS identificamos três mutações (Tabela 2), sendo todas previamente conhecidas por causar a resistência a esta droga (WHO, 2018; NUSRATH, 2017; CHANG, 2011).

A estreptomicina, uma das mais antigas drogas do tratamento da TB, continua sendo amplamente usada em Moçambique nos esquemas de re-tratamento dos casos de TB sensível (MISAU-PNCT, 2014).

Dois genes diferentes estão implicados no desenvolvimento de resistência do *M. tuberculosis* a estreptomicina, sendo eles o gene *rpsL* que está associado a resistência de alto nível e o gene *rrs* que confere resistência de nível moderado (TUDÓ et al., 2010; WONG et al., 2011; JAGIELSKI et al., 2014; WHO, 2018). Um total de 21 cepas apresentaram mutações de resistência a estreptomicina com predominância 95%(20) no gene *rpsL*. Todas as cepas com resistência a estreptomicina, apresentaram concomitantemente resistência a INH. Esta associação amplamente descrita, pode justificar-se pela longa exposição em casos de re-tratamento e antiguidade da estreptomicina no tratamento da TB (SCARDIGLI, 2014).

A maioria dos casos de resistência ao etambutol ocorre devido a mutações no codão 306 do gene *embB* mutações nos genes *embA* e *embC* não estão associados a resistência (TELENTI et al., 1997; ALMEIDA DA SILVA, 2011). Do total de 18 cepas que pelo WGS evidenciaram mutações no gene *emb*, 56%(10) ocorreram no gene *embB* o que infere resistência ao EMB.

6.2.3 Perfil de resistência as drogas de segunda linha (fluoroquinolonas, drogas injetáveis de segunda linha e etionamida)

Resistência a FQL ocorrem devido a mutações no “*quinolone resistance-determining region*” (QRDR) do genes *gyrA* e *gyrB* especificamente e frequentemente nos codões 90 e 94 do *gyrA* (SUN et al., 2008; ALMEIDA DA SILVA, 2011).

Resistencia a FQL por mutações no gene *gyrB* é incomum (ALMEIDA DA SILVA, 2011). Neste estudo, em 100% das cepas que evidenciaram resistência a

FQL, esta ocorreu devido a mutações no gene *gyrA* (Tabela 2). Este achado, é consistente como os dados do nosso estudo prévio com isolados da Beira onde a frequência de mutações no *gyrA* ocorreu em 100% dos isolados com resistência a FQL (NAMBURETE et al., 2016).

Através do WGS também avaliamos resistência as drogas injetáveis de segunda linha sendo elas: kanamicina (KNA), amicacina (AMK) esta que são aminoglicosídeos; capreomicina (CAP) e viomicina (VIO) que são peptídeos cíclicos. Ambas classes apresentam resistência cruzada. O mecanismo molecular mais comum de resistência as drogas injetáveis de segunda linha está associado a uma mutação A1401G no gene *rrs* que codifica rRNA 16S. Esta mutação é evidente em cepas que exibem resistência de alto nível a KNA e AMK (ALMEIDA DA SILVA, 2011). Mutações na posição -10 e -35 da região do promotor do gene *eis* estão associadas a resistência de baixo nível a KNA (ZAUNBRECHER et al., 2009).

No nosso estudo prévio observamos que a resistência as drogas injetáveis é infrequente na Beira (NAMBURETE et al., 2016). Neste estudo, validamos nossa observação prévia ao detectarmos apenas uma cepa com resistência a drogas injetáveis por mutação no gene *eis*.

Em relação à etionamida, não foi observada nenhuma mutação associada a resistência do *M. tuberculosis* a esta droga.

6.2.4 Perfil de resistência multidroga – MDR

Considera-se resistência multidroga quando *in vitro* as cepas evidenciam resistência simultaneamente a isoniazida e rifampicina (WHO, 2018).

A prevalência de TB resistente ainda não é conhecida no país. Mas, dados disponíveis indicam uma tendência crescente de casos de TB-MDR. Ora, vejamos que o Inquérito Nacional de Resistência aos tuberculostáticos 2007/2008 reportou uma prevalência da TB-MDR primária de 3.5% e adquirida de 11.6% (SAMO GUDO et al, 2011). Em 2014, o PNCT do Ministério da Saúde, reportou um cumulativo dos últimos 5 anos de 482 casos de TB resistente, mostrando ainda que a proporção de casos notificados no país aumentou de 5% em 2010 para 19% em 2014 (MISAU-PNCT, 2014). PIRES et al. (2014) em um estudo feito em Moçambique com uma casuística de 641 pacientes, encontrou uma frequência de TB-MDR de 280

(43,6%), embora esta elevada frequência no estudo deveu-se ao facto de eles terem usado amostras do laboratório nacional de referência de TB no país. Nosso estudo prévio, com uma casuística de 155 isolados da Beira, encontramos uma frequência de 16.1% de TB_MDR (NAMBURETE et al., 2016). No presente estudo, o WGS evidenciou uma frequência de 45.7% confirmando assim que esta forma de doença tende a ser frequente no país e urge a necessidade de melhorar as estratégias de controle de infecção tanto nas comunidades assim como nas unidades de saúde.

6.2.5 Perfil de resistencia extensiva – XDR

Cepas com resistência extensiva são aquelas que apresentam-se com resistência a INH, RMP, uma droga injetável de segunda linha e uma fluoroquinolona usada no tratamento da TB.

O surgimento de cepas XDR é um indicador direto de falha na condução dos casos de TB-MDR (NUERMBERGER, 2012; SIQUEIRA et al., 2009). A tuberculose causada por cepas XDR continua sendo pouco frequente em Moçambique.

Dados do MISAU indicam que até 2014 havia um cumulativo de 22 casos de TB-XDR notificados e confirmados. Em 2018, o número aumentou para um cumulativo de 31 casos confirmados. PIRES et al. (2014) em uma casuística de 641 pacientes dos quais 280 tinham TB-MDR, a TB-XDR foi confirmada em apenas 2 (0.71%) pacientes.

No nosso estudo prévio com 155 amostras de isolados da Beira, não ocorreu nenhuma cepa com perfil XDR. Nesta nossa pequena amostra de 35 cepas, apenas 1 (3%) apresentou perfil XDR (Tabela 2). Este achado confirma mais uma vez que TB por cepas XDR constituem um facto incomum na Beira e de uma forma geral em Moçambique.

6.3 Discrepâncias entre testes moleculares MTBDR*plus* , MTBDR*sl* e WGS na determinação de mutações que conferem resistência as drogas

Comparado com os DST atualmente disponíveis, o WGS apresenta muitas vantagens do ponto de vista clínico assim como epidemiológico uma vez que permite a análise e descrição de todo o genoma das cepas avaliadas, possibilitando assim a identificação de mutações de resistência que possam localizar-se em genes não previamente conhecidos por portar mutações de resistência as drogas (PAPAVENTSIS et al., 2017; TAKIFF, 2015; EI PW et al., 2016).

Apesar destas vantagens, o elevado custo constitui um fator limitante para o uso da tecnologia de WGS como rotina, nos laboratórios de referência de TB com objetivo de inferir fenótipos de TB resistente em países com elevada frequência e tendência crescente de casos de TB como ocorrem em Moçambique.

Com a queda dos custos, a tecnologia WGS poderia ser utilizada como padrão ouro para o diagnóstico preciso da resistência, de forma a facilitar a gestão clínica e precoce das formas resistente da doença, adequar as medidas de controle de infecção nas formas sensíveis e resistentes da doença, contribuindo assim positivamente para o fim a epidemia de TB no mundo de acordo com os objetivos da estratégia END TB (ROETZER et al., 2013; KATO-MAEDA et al., 2013; EI PW et al., 2016).

Em relação ao perfil de sensibilidade global das 35 cepas avaliada, o WGS foi mais específico na identificação de resistência visto que com base neste teste, 33 cepas foram consideradas resistentes enquanto que 2 não exibiram mutações de resistência. Sendo que, pelos testes moleculares combinados MTBDR*plus* e MTBDR*sl*, das 35 cepas apenas 1 não exibiu mutações de resistência.

É possível que na cepa ID 3026, a resistência a INH tenha sido falso positivo detectado pelo teste molecular; também existe a possibilidade de viés de cultura isto é: na amostra deste isolado pode ser que existiam duas populações de *M. tuberculosis* (sensíveis e resistentes), que durante o subcultivo na ausência das drogas, a população resistente perdeu se permanecendo somente a população sensível. Este caso poderia ter sido esclarecido se tivéssemos tido contato direto e seguimento clínico dos pacientes de forma a avaliar o desfecho dos casos. Outra

possibilidade poderia ter sido o recultivo do isolado para possibilitar a repetição do teste molecular, mas estas foram umas das nossas limitações.

WGS identificou mutações de resistência a FQL que não foram evidenciadas pelos testes moleculares em três cepas (ID 2721; ID 2852 e ID 3185). Este nosso achado constitui mais uma evidencia da superioridade do WGS em relação a precisão e acurácia no diagnóstico da resistência do *M. tuberculosis* as drogas.

6.4 Comparação do perfil de resistência às drogas por linhagens filogenéticas

Das sete linhagens filogenéticas conhecidas do MTBC, sabe-se que a L4 adaptou-se bem aos humanos, e ocorre com frequência significativa em todos os continentes do mundo (GAGNEUX, 2012; FIRDESSA et al., 2013). Por este motivo, é considerada a principal linhagem causadora da TB em humanos a nível mundial (COSCOLLA, 2014; STUCKI et al., 2016).

Na nossa amostra, a L4 ocorreu com frequência significativa (71.4%) sendo que destes, a sublinhagem 4.3 também conhecida com *Latin-American-Mediterranean* (LAM) exibiu-se com maior predominância (80%).

Duas teorias sustentam a presença e a frequência da L4 em África: a teoria do ancestral comum originado em África que infectou humanos por milhões de anos e que a migração dos humanos para fora da África, o aumento da densidade populacional na era Neolítica tenham sido os fatores que facilitaram a expansão desta linhagem para as diversas regiões do mundo (HERSHBERG et al., 2008; GAGNEUX, 2012; COMAS et al., 2013); a outra e a teoria do “*out-of-and-back-to-africa*” (HERSHBERG, et al., 2008) que é sustentada por estudos que identificaram marcas moleculares de expansão recente (WIRTH et al., 2008).

Considerando estas teorias, sabendo que para além do comércio de escravos na era pré-colonial, Moçambique é uma ex-colônia de um país Europeu (Portugal) portanto, a presença da L4 nos isolados do nosso estudo era esperada.

Há escassez de estudos que descrevem a epidemiologia molecular da TB em

Moçambique, especialmente as linhagens de MTBC. Mas, dos poucos estudos disponíveis, a frequência de L4 especificamente LAM, foi também evidenciada por Saifodine et al., (2016) na Beira quando descreveu a diversidade genética de isolados de *M. tuberculosis* usando a técnica MIRU-VNTR, onde em um total de 67 isolados 25 corresponderam a LAM. A presença de L4 em isolados de Moçambique foi observada também em 37% do total de 445 isolados em *Spoligotype* por Viegas et al., (2010). A frequência de L4 e também um achado comum nos dois países que partilham fronteira com Moçambique: Zimbabwe e Zâmbia (MULENGA et al., 2010; GUERRA-ASSUNÇÃO et al., 2015) e usam frequentemente o porto da Beira, portanto, há constante migração de pessoas entre Moçambique a cidade da Beira e estes dois países.

Linhagem 2 que inclui a subfamília Beijing, conhecida como a mais virulenta das 7 linhagens filogenética do MTBC, e associada a distribuição massiva de resistência as drogas dada a sua capacidade de tolerar mutações, mas sem a virulência (JIMÉNEZ et al., 2017; RODRÍGUEZ-CASTILLO et al., 2017), ocorreu em 14.3% das cepas na nossa amostra. Neste estudo a porcentagem de casos pré-XDR e XDR entre as três linhagens detectadas mostrou que ela foi três vezes superior na linhagem 2 (60%) do que na Linhagem 4 (20%). A ocorrência significativa desta linhagem na nossa amostra, diferentemente dos estudos prévios que também usaram dados da Beira, justifica-se pela elevada frequência de cepas MDR e pré-XDR no nosso estudo uma vez que somadas estas representaram 74.2% da amostra.

6.5 Análise filogenética e epidemiológica

Do ponto de vista epidemiológico da TB, WGS revolucionou o conhecimento das cadeias de transmissão em surtos ou epidemias da TB, factor chave para direccionar os esforços de controle da TB no mundo (KATO-MAEDA et al., 2013; EI PW et al., 2016).

No nosso estudo, com base nas estimativas de divergência evolutiva entre sequências, observamos que cepas de alguns isolados estão intimamente relacionadas isto porque estas cepas tiveram pequena distância genética (definida

como 5 SNPs), enquanto que os outros isolados mostraram maior distância genética (definida como 10 e 15 SNPs) (Figura 4). Portanto, observamos três possíveis cadeias de transmissão. O deficiente preenchimento dos dados nos prontuários clínicos impossibilitou a disponibilização da informação para completarmos a análise de georeferenciamento e este foi um fator limitante na descrição completa das cadeias de transmissão.

Sabe-se que globalmente a resistência a INH é mais frequente em relação à RMP (WHO, 2018). Em Moçambique, dos poucos estudos disponíveis na literatura que descrevem TB resistente, confirmam a predominância de isolados com resistência a INH quando comparado as outras drogas anti-TB (PIRES et al., 2014; BOLLELA et al., 2016; NAMBURETE et al 2016; VALENCIA et al., 2017). Nas cadeias de transmissão identificadas, foi evidente que nem todos os isolados tinham o mesmo perfil de resistência, o que pode implicar na presença endêmica de cepas com monoresistência a INH, que subsequentemente desenvolvem resistência a RMP e então se espalham.

6.6 Limitações do estudo

Dentre as limitações que este estudo apresenta, destacamos o deficiente preenchimento dos prontuários médicos dos pacientes de onde obtivemos os isolados que foram analisados, o que influenciou negativamente a análise de georeferenciamento e consequentemente dificultou a descrição completa das cadeias de transmissão identificadas.

É necessário pontuar que as cepas analisadas e descritas neste estudo, são as que tiveram WGS feito e o resultados disponível, e não todas as identificadas nos pacientes no período do estudo. O elevado custo financeiro da tecnologia WGS, fez com que definíssemos um menor tamanho amostral fato que limita a validade externa dos resultados do estudo.

A falta do contato direto com os pacientes, conjugado ao deficiente preenchimento das fichas de seguimento dos pacientes e livros de registro,

dificulta o conhecimento do desfecho dos casos de TB limitando desta forma a análise comparativa dos perfis de resistência entre testes moleculares e WGS.

E, por fim, a não realização dos DST fenotípicos também limitou a análise comparativa do perfil de resistência das drogas não avaliadas pelos testes moleculares.

7. CONCLUSÃO

Apesar de todas as sete linhagens filogenéticas de *M. tuberculosis* atualmente conhecidas ocorrerem na África, em Moçambique e mais especificamente na Beira, apenas três foram identificados neste estudo como causadores de TB, especialmente a TB-DR. Destas, a linhagem 4.3 (Latin-American-Mediterranean), conhecida por ser a linhagem mundialmente dispersa, domina a frequência na Beira. Dado ao aumento progressivo dos casos de tuberculose resistente às drogas que tem se notado na Beira, cepas da família Beijing universalmente conhecidas, por estarem associadas à virulência e distribuição massiva de resistência, começam a tornar presentes nesta região do país.

Uma vez que Beira é uma cidade costeira, banhada pelo oceano Índico, considera-se óbvia a ocorrência de L1. A demonstração de cepas genéticas e intimamente relacionadas, sendo elas obtidas no mesmo laboratório, é uma evidência da existência de lacunas no cumprimento correto das medidas de controle de infecção. Assim sendo, urge a necessidade de melhorar as estratégias e práticas de controle de infecção, tanto na comunidade, assim como nas Unidades de Saúde.

Estudos com maior tamanho amostral são necessários para melhor compreensão da cadeia de transmissão da epidemia de TB na Beira, especificamente das formas resistentes desta doença, permitindo, assim, o delineamento de melhores estratégias de controle da TB, facilitando o alcance das metas preconizadas pela estratégia mundial END TB.

8. REFERÊNCIAS

Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **J Antimicrob Chemother** 2011;66(7):1417-30.

Bañuls AL, Sanou A, Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. **J Med Microbiol** 2015;64(11):1261-9.

Bollela VR, Namburete EI, Feliciano CS, Macheque D, Harrison LH, Caminero JA. Detection of *katG* and *inhA* mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis** 2016;20(8):1099-104.

Borrell S, Gagneux S (2009) Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis** 2015; 13:1456-1466

Brites D, Gagneux S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Adv Exp Med Biol** 2017;1019:1-26.

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol** 2006;6:23.

Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, Grandjean L, Monteserin J, Debech N, et al. **Global Expans Sci Adv** 2018;4(10):5869.

Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. **Clin Microbiol Infect** 2014;20(3):196-201.

Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Clin Microbiol** 2006; 44: 2338–2342.

Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. **Antimicrob Agents Chemother** 2011;55(10):4499–505.

Chatterjee A, Nilgiriwala K, Saranath D, et al. Whole genome sequencing of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Mumbai, India: a potential tool for determining drug-resistance and strain lineage. **Tuberculosis** (Edinb) 2017;107:63–72.

Chihota VN, Niehaus A, Streicher EM, Wang X, Sampson SL, Mason P, et al. Geospatial distribution of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Africa. **PLoS One** 2018. doi:10.1371/journal.pone.0200632.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature** 1998;393(6685):537-44.

Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. **Genome Med** 2015;7(1):51.

Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K. E., Kato- Maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S. & other authors. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans **Nat Genet** 2013; 45, 1176–1182.

Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Semin Immunol** 2014; 26:431–44. [PubMed: 25453224].

De Jong, B. C., Antonio, M. & Gagneux, S.. *Mycobacterium africanum*—review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. **PLoS Negl Trop Dis** 2010; 4, 744.

Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. **Int J Tuberc Lung Dis** 2016;20(1):24–42.

Ei PW, Aung WW, Lee JS, Choi GE, Chang CL. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods. **J Korean Med Sci** 2016;31(11):1673-83.

Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, Williams SG, Sergouniotis PI, O'Sullivan J, et al. Whole Genome Sequencing Increases Molecular Diagnostic Yield Compared with Current Diagnostic Testing for Inherited Retinal Disease. **Ophthalmology** 2016;123 (5):1143-50.

Feliciano CS, Namburete EI, Rodrigues Praça J, Peronni K, Dippenaar A, Warren RM, et al. Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique. **Tuberculosis (Edinb)** 2018;110:59-67.

Firdessa R, Berg S, Hailu E, Schelling E, Gumi B, Erenso G, et al. *Mycobacterial* lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. **Emerg Infect Dis** 2013;19(3):460-3.

Firdessa, R., Berg, S., Hailu, E., Schelling, E., Gumi, B., Erenso, G., Gadisa, E., Kiros, T., Habtamu, M. & other authors . *Mycobacterial* lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. **Emerg Infect Dis** 2013; 19, 460–463.

Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiology** 1998;144 (Pt 5):1189-96.

Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. **Lancet Infect Dis** 2007;7(5):328-37.

Gagneux S. Genetic Diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Pieters J., McKinney J. (eds) Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2013, vol 374. Springer, Berlin, Heidelberg https://doi.org/10.1007/82_2013_329

Gagneux, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2012; 367, 850–859.

Guerra-Assunção JA, Crampin AC, Houben RM, Mzembe T, Mallard K, Coll F, et al. Large-scale whole genome sequencing of *M. tuberculosis* provides insights into transmission in a high prevalence area. **Elife** 2015;4. doi:10.7554/eLife.05166.

HAINE LIFESCIENCE. Genotype MTBDRplus rev 2.0. Instructions for use 2012. https://www.ghdonline.org/uploads/MTBDRplusV2_0212_304A-02-02. Accessed January 25, 2019.

HAINE LIFESCIENCE. Genotype MTBDRsl rev 2.0. Instructions for use 2015. https://www.immunodiagnostic.fi/wp-content/uploads/MTBDRsl-V2_kit-insert. Accessed January 25, 2019.

Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P. M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J. C., Kremer, K., Petrov, D. A. & other authors. High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography 2008; **PLoS Biol**; 4, 311.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA. Moçambique. **Apresentacao-resultados-do-senso-2017**; Maputo 2018. Disponível em: <http://www.ine.gov.mz/iv-rgrph-2017/mocambique/apresentacao-resultados-do-censo-2017-1>

Jagielski T, Ignatowska H, Bakula Z, et al. Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Poland. **PLoS One** 2014;9(6): 100078.

Jiménez P, Calvopiña K, Herrera D, Rojas C, Pérez-Lago L, Grijalva M, et al. [Identification of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage in Ecuador]. **Biomedica** 2017;37(2):233-7.

Kato-Maeda M, Gagneux S, Flores LL, Kim EY, Small PM, Desmond EP, et al. Strain classification of Mycobacterium tuberculosis: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes. **Int J Tuberc Lung Dis** 2011;15(1):131-3.

Kato-Maeda M, Ho C, Passarelli B, Banaei N, Grinsdale J, Flores L, et al. Use of Whole Genome Sequencing to Determine the Microevolution of Mycobacterium tuberculosis during an Outbreak. **PLoS One** 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0058235.

Kato-Maeda M, Ho C, Passarelli B, Banaei N, Grinsdale J, Flores L, et al. Use of whole genome sequencing to determine the microevolution of Mycobacterium tuberculosis during an outbreak. **PLoS One** 2013;8(3):e58235.

Kiepiela P, Bishop K S, Smith A N, Roux L, York D F. 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 Lung Dis** 2000; 80: 47–56.

Larsen MH, Biermann K, Tandberg S, Hsu T, Jacobs WR. Genetic Manipulation of Mycobacterium tuberculosis. **Curr Protoc Microbiol** 2007; Chapter 10:Unit 10A.2.

Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList--10 years after. **Tuberculosis** (Edinb) 2011;91:1–7. doi:10.1016/j.tube.2010.09.008.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** 2009;25(14):1754-60.

Maurya A K, Singh A K, Kant S, et al. Use of GenoType^W MTBDRplus assay to assess drug resistance and mutation patterns of multidrug-resistant tuberculosis isolates in northern India. **Indian J Med Microbiol** 2013; 31: 230–236.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Res** 2010. doi:10.1101/gr.107524.110.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Maputo. Direção Nacional de Saúde Publica. Programa Nacional de Controlo da Tuberculose (PNCT). **Relatório das Atividades Desenvolvidas durante o ano 2014**. Maputo, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Maputo. Direção Nacional de Saúde Pública. Programa Nacional de Controlo da Tuberculose (PNCT). **Relatório das Atividades Desenvolvidas durante o ano 2018**. Maputo, 2019.

MINISTERIO DA SAUDE. Maputo. **Relatório Annual 2017**. Relatorio Annual das Actividades relacionadas ao HIV/SIDA; Maputo 2018. Disponível em www.misau.gov.mz/index.php/relatorios-semestrais?download=172:elatorio-semestral-hiv-2018-final

Mulenga C, Shamputa IC, Mwakazanga D, Kapata N, Portaels F, Rigouts L. Diversity of Mycobacterium tuberculosis genotypes circulating in Ndola, Zambia. **BMC Infect Dis** 2010. doi:10.1186/1471-2334-10-177.

Namburete EI, Tivane I, Lisboa M, Passeri M, Pocente R, Ferro JJ, et al. Drug-resistant tuberculosis in Central Mozambique: the role of a rapid genotypic susceptibility testing. **BMC Infect Dis** 2016;16:423.

Nusrath Unissa A, Hanna LE. Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era. **Tuberculosis** (Edinb) 2017;105:96–107.

Ocheretina O, Shen L, Escuyer VE, Mabou MM, Royal-Mardi G, Collins SE, et al. Whole Genome Sequencing Investigation of a Tuberculosis Outbreak in Port-au-Prince, Haiti Caused by a Strain with a "Low-Level" rpoB Mutation L511P - Insights into a Mechanism of Resistance Escalation. **PLoS One** 2015;10(6):e0129207.

Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniewski F, Cirillo DM, Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of drug resistance: a systematic review. **Clin Microbiol Infect** 2017;23(2):61-8.

Parwati I, Alisjahbana B, Apriani L, Soetikno RD, Ottenhoff TH, van der Zanden AG, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype is an independent risk factor for tuberculosis treatment failure in Indonesia. **J Infect Dis** 2010;201(4):553-7.

Ponstingl H, Ning Z. SMALT - A New Mapper for DNA Sequencing Reads. **F1000Posters** 2010. doi:10.7490/F1000RESEARCH.327.1.

Rodríguez-Castillo JG, Pino C, Niño LF, Rozo JC, Llerena-Polo C, Parra-López CA, et al. Comparative genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis Beijing-like strains revealed specific genetic variations associated with virulence and drug resistance. **Infect Genet Evol** 2017;54:314-23.

Rodríguez-Castillo JG, Pino C, Niño LF, Rozo JC, Llerena-Polo C, Parra-López CA, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing-like strains revealed specific genetic variations associated with virulence and drug resistance. **Infect Genet Evol** 2017;54:314-23.

Saifodine A, Fyfe J, Sievers A, Coelho E, Azam K, Black J. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained from patients with pulmonary tuberculosis in Beira city, Mozambique. **Int J Mycobacteriol** 2014;3(2):94-100.

Saifodine A, Fyfe J, Sievers A, Coelho E, Azam K, Black J. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained from patients with pulmonary tuberculosis in Beira city, Mozambique. **Int J Mycobacteriol** 2014;3(2):94-100.

Sauvage T, Plouviez S, Schmidt WE, Fredericq S. TREE2FASTA: A flexible Perl script for batch extraction of FASTA sequences from exploratory phylogenetic trees. **BMC Res Notes** 2018. doi:10.1186/s13104-018-3268-y.

Scardigli A, Caminero JA. Management of drug-resistant tuberculosis. **Curr Respir Care Rep** 2013;2:208–17.

Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, van Soolingen D, Glyn Hewinson R, Maynard Smith J. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J Theor Biol** 2005 239:220–225

Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. **Nat Genet** 2016;48:1535–43. doi:10.1038/ng.3704.

Sun Z, Zhang J, Zhang X, et al. Comparison of *gyrA* gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. **Int J Antimicrob Agents** 2008;31(2):115–21.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. **J Clin Microbiol** 2001;39(10):3563-71.

Takiff HE, Feo O. Clinical value of whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet Infect Dis** 2015;15(9):1077-90.

Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. **Nat Med** 1997;3(5):567-70.

Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids Res** 1990;18(1):188.

Tudó G, Rey E, Borrell S, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. **J Antimicrob Chemother** 2010;65(11):2341–6.

Valencia S, Respeito D, Blanco S, Ribeiro RM, López-Varela E, Sequera VG, et al. Tuberculosis drug resistance in Southern Mozambique: results of a population-level survey in the district of Manhica. **Int J Tuberc Lung Dis** 2017;21(4):446-51.

van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. **J Clin Microbiol** 2002;40(12):4628-39.

van Soolingen D. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* as an epidemiological marker. **Lancet Respir Med** 2014;2(4):251-2.

Viegas SO, MacHado A, Groenheit R, Ghebremichael S, Pennhag A, Gudo PS, et al. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique. **BMC Microbiol** 2010; doi:10.1186/1471-2180-10-195.

Vivek Kapur, Thomas S. Whittam, James M. Musser, Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 Years Old?, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 170, Issue 5, November 1994, Pages 1348–1349, <https://doi.org/10.1093/infdis/170.5.1348>

Vynnycky E, Fine PE. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. **Epidemiol Infect** 1997;119(2):183-201.

WHO,2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311389/9789241529-eng.pdf?ua=1>

Winglee K, Manson McGuire A, Maiga M, et al. Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium africanum* strains from Mali provides insights into the mechanisms of geographic restriction. **PLoS Negl Trop Dis** 2016;10(1):e0004332.

Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguet, C., Woßbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Rüsch-Gerdes, S., Locht, C. & other authors. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **PLoS Pathog** 2008; (4): e1000160.

Witney AA, Cosgrove CA, Arnold A, et al. Clinical use of whole genome sequencing for Mycobacterium tuberculosis. **BMC Med** 2016;14:46.

Wong SY, Lee JS, Kwak HK, et al. Mutations in gidB confer low-level streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother** 2011; 55(6):2515–22.

World Health Organization (WHO). Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. Geneva: World Health Organization; 2008. http://www.who.int/tb/featuresarchive/policy_statement.pdf.

World Health Organization. Global tuberculosis. **Geneva**: 2018.

World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland: **World Health Organization** 2016.

Zaunbrecher MA, Sikes RD, Metchock B, Shinnick TM, Posey JE. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2009; 106(47):20004-9.

9. ANEXOS

REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma Senhora
Dr^a Evangelina Inácio Namburete
UCM

Ref: 359/CNBS/14

Data 03 de Novembro de 2014

Assunto: Parecer do Comité Nacional de Bioética para saúde (CNBS) sobre o estudo: "*Perfil de Sensibilidade das Cepas de Mycobacterium tuberculosis isolados em pacientes com tuberculose (TB) e co-infecção TB-HIV em Sofala, Moçambique*"

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) fez a avaliação das correcções efectuadas no protocolo intitulado: "*Perfil de Sensibilidade das Cepas de Mycobacterium tuberculosis isolados em pacientes com tuberculose (TB) e co-infecção TB-HIV em Sofala, Moçambique*"

Registado no CNBS com o número 82/CNBS/2014, conforme os requisitos da Declaração de Helsínquia,

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação aos seguintes documentos:

- Protocolo (versão final) de 2014
- Instrumento de recolha de dados (versão final) de 2014
- Consentimento Informado (versão final) de 2014

Todavia, o CNBS informa que:

- 1- A presente aprovação não substitui a autorização administrativa.
- 2- Não houve declaração de conflitos de interesse por nenhum dos membros do CNBS.
- 3- A aprovação terá a validade de um ano, terminando esta a 03 de Novembro de 2015. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.
- 4- Recomenda-se aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.
- 5- A lista actualizada dos membros do CNBS esta disponível na secretaria do Comité.

Com as nossas mais cordiais saudações.

O Presidente

Dr. João Fernando Lima Schwalbach

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320

University of Pittsburgh
Institutional Review Board

3500 Fifth Avenue
Pittsburgh, PA 15213
(412) 383-1480
(412) 383-1508 (fax)
<http://www.irb.pitt.edu/>

Memorandum

To: Lee Harrison

From: IRB Office

Date: 1/6/2015

IRB#: [PRO14120250](#)

Subject: Profile of susceptibility of strains of mycobacterium tuberculosis isolated from patients with TB co infection and TB/HIV in Sofala, Mozambique

The above-referenced protocol has been reviewed by the University of Pittsburgh Institutional Review Board. Based on the information provided to the IRB, this project includes no involvement of human subjects, according to the federal regulations [§45 CFR 46.102(f)]. That is, the investigator conducting research will not obtain information about research subjects via an interaction with them, nor will the investigator obtain identifiable private information. Should that situation change, the investigator must notify the IRB immediately.

Given this determination, you may now begin your project.

This study is supported by the following federal grant application:
5D43TW001038-15 REVISED AIDS international Training and Research Program

Please note the following information:

- If any modifications are made to this project, use the "**Send Comments to IRB Staff**" process from the project workspace to request a review to ensure it continues to meet the determination.
- Upon completion of your project, be sure to finalize the project by submitting a "**Study Completed**" report from the project workspace.

Please be advised that your research study may be audited periodically by the University of Pittsburgh Research Conduct and Compliance Office.