

# Caracterização do perfil de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* isolado de pacientes da cidade de Beira, Sofala - Moçambique

*Characterization of resistance profile of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with tuberculosis in Beira, Sofala - Mozambique*

Evangelina Inácio Namburete<sup>1</sup>; Miguelhete Lisboa<sup>2</sup>; Inês Tivane<sup>3</sup>; Lee Harrison<sup>4</sup>; Valdes Roberto Bollela<sup>5</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o perfil de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* isolado de pacientes da cidade de Beira, Sofala, Moçambique.

**Método:** Estudo descritivo transversal, que analisou dados secundários de pacientes que tiveram cultura positiva para *M. tuberculosis* MGIT960-BACTEC™. Para cada isolado foram revistos dados demográficos do respetivo paciente, a sorologia para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o resultado do teste rápido molecular (TRM) - GeneXpertα-Cepheid e o teste de fenotípico de sensibilidade aos fármacos (TS) de primeira linha. Os testes foram realizados no Laboratório de Referência para tuberculose na cidade de Beira, Moçambique no período de Janeiro de 2014 a Março de 2015.

**Resultados:** Foram analisadas 87 isolados de *M. tuberculosis* de pacientes da província de Sofala, Moçambique. Desses, 33/87 (37,9%) apresentaram algum tipo de resistência do bacilo aos fármacos anti-TB, enquanto que em 54/87 (62,1%) a resistência não foi detectada. Dos 33 isolados com resistência: 18/33 (54,7%) foram classificados como multidrogarresistentes (TB-MDR), 11/33 (33,3%) monorresistentes à isoniazida (INH), e 2/33 (6%) monorresistentes à rifampicina (RMP) e 2/33 (6%) resistentes ao Etambutol. Do total de isolados com resistência à INH, 5/11 (42%) também apresentavam resistência à estreptomina (Sm). De 49 pacientes que fizeram sorologia para HIV, 30/49 (61,2%) tinham infecção confirmada pelo HIV, sendo esta duas vezes mais frequente entre os pacientes portadores do *Mycobacterium tuberculosis* resistente do que naqueles com bacilo sensível. Todos isolados resistentes a RIF e INH eram pacientes com história prévia de tratamento para TB.

**Conclusão:** Observa-se uma alta proporção de coinfeção HIV/TB entre pacientes portador de cepas do *M. tuberculosis* monorresistente ou MDR. Além de alta taxa de monorresistência à isoniazida, e a associação entre resistência concomitante à INH e Sm.

**Palavras chaves:** Mycobacterium tuberculosis. Resistência a Fármacos. Isoniazida.

## ABSTRACT

**Objective:** To analyze the resistance profile of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Beira, Sofala, Mozambique.

**Method:** Descriptive cross-sectional study that analyzed secondary data from patients who had positive culture for *M. tuberculosis* on MGIT960-BACTEC™. For each patient, demographic data, information of

1. Médica; Mestranda em Clínica Médica da FMRP-USP.
2. Médico; Centro de Investigação Operacional da Beira.
3. Bióloga; Laboratório de Tuberculose do Hospital Central da Beira.
4. Médico; Professor Associado da GSPH - University of Pittsburgh, USA.
5. Médico; Professor Doutor da Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais da FMRP-USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Correspondência  
Valdes Roberto Bollela  
Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

Recebido em 13/07/2015  
Aprovado em 18/12/2015

Human Immunodeficiency Virus (HIV) serology, rapid molecular test - GeneXpert $\alpha$ -Cepheid result and first line drug susceptibility test (DST) were reviewed. All tests were performed in the Referral Laboratory of Tuberculosis in Beira, from January 2014 to March 2015.

**Findings:** Totally of 87 isolates from Sofala province, Mozambique were analyzed. Of these, 33/87 (37.9%) isolates had any anti-TB drug resistance detected while in 54/87 (62.1%) the drug resistance was not detected. Among the 33 isolates with drug resistance: 18/33 (54,7%) were multidrug-resistant (MDR), 11/33 (33,3%) were Isoniazid (INH) mono-resistant, 2/33 (6%) Rifampicin (RIF) mono-resistant and 2/33 (6%) were Etambutol mono-resistant. Of the total isolates with resistance to INH, 5/11 (42%) were additionally resistance to streptomycin (Sm). Of the 49 patients with HIV serology known, 30 (61,2%) were confirmed HIV positive. The HIV infection was two times more frequent among patients with drug resistant compared to those without drug resistance. All isolates resistant to INH and RIF (MDR) had previous history of tuberculosis treatment.

**Conclusion:** There is high proportion of co-infection TB/HIV among patients with any drug resistant TB MDR or monoresistance. We also observed high frequency of monoresistance to isoniazid and association of drug resistance between isoniazid and streptomycin.

**Key Words:** Mycobacterium tuberculosis. Drug Resistance. Isoniazid.

## Introdução

A tuberculose (TB) continua sendo mundialmente a segunda causa de morte por doenças infecciosas.<sup>1,2,3</sup> O número de casos vinha diminuindo em várias regiões do mundo, mas a partir da década de 1980, com o surgimento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), a TB voltou a ganhar destaque como um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo.

Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, com elevada incidência no sudeste Asiático e na África. Em 2013 a África foi responsável por 24% dos casos novos de TB em nível mundial. A maioria destes casos concentram-se na região sub-sahariana.<sup>4,5</sup>

Concomitantemente observa-se na África um aumento significativo de casos de TB causados por bacilos resistentes aos fármacos de primeira e de segunda linha.<sup>4</sup> Moçambique ocupa a sexta posição na lista dos 10 países com maior número de casos de TB por habitante (522casos/100.000 habitantes) em nível mundial.<sup>5</sup> Em Moçambique o número de casos de TB notificados anualmente pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) continua em ascensão. Em 2010 foram notificados 46.174, sendo que 53% estavam coinfectados; em 2014 foram 58.270 casos, com taxa de confecção de 50,3%. Este aumento de número de casos pode ser justifi-

cado pela introdução do GeneXpert MTB/RIF em 2012 no país. Pois, esse teste molecular de diagnóstico da TB e da resistência a rifampicina apresenta uma elevada sensibilidade e é bastante simples de ser realizado. Assim pode ter aumentou não só a detecção dos casos mas também a notificação.<sup>6</sup>

Por conta da alta frequência da co-infecção entre o HIV e TB, em 2013, Moçambique aderiu à recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento em massa da TB latente com isoniazida (INH) em todo indivíduo que estivesse infectado pelo HIV, independentemente do resultado do teste tuberculínico e do grau de imunodepressão do paciente, após excluir doença ativa.<sup>7</sup>

Em Moçambique, o primeiro inquérito de vigilância de TB multidroga resistente foi realizado no período de 1998/1999. Neste trabalho a frequência de TB-MDR foi de 3,3% em casos novos e 3,5% nos casos previamente tratados. O segundo inquérito para avaliação da evolução da TB-MDR no país terminou no final de 2008 e revelou uma prevalência idêntica quanto à resistência primária de 3,4%.<sup>14</sup> Entretanto, este estudo mostrou que houve um aumento de três vezes em dez anos na resistência adquirida (3,5% para 11,2%) e a frequência do TB-MDR foi elevada em indivíduos coinfectados pelo HIV, tendo um risco relativo de 2,4 (95% CI 1,2 – 4,8).<sup>14</sup> Considera-se que a província de Sofala atualmente tenha uma das maiores prevalências (5,8%) de TB resistente no país.

Esse estudo teve como objetivo descrever o perfil de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* isolado de pacientes da cidade de Beira, Sofala, Moçambique e a coinfeção TB/HIV.

## Metodologia

Esse é um estudo descritivo transversal, realizado na cidade da Beira, província de Sofala, em Moçambique no período compreendido de janeiro de 2014 a março de 2015. Todos os dados de micobacteriológico e biologia molecular foram obtidos a partir dos registros do Laboratório Regional de Referência da Tuberculose da cidade da Beira, referência para as províncias de Tete, Manica e todos os distritos da província de Sofala.

Neste estudo, foram analisados 87 *Mycobacterium tuberculosis* isolados de amostras clínicas por meio de cultura líquida (MGIT960-BACTEC™) durante o período do estudo. Todas as amostras clínicas foram também testadas utilizando o TRM (GeneXpertMTB/RIF-Cepheid\_USA). Somente os isolados que apresentaram resistência à rifampicina e as amostras de pacientes que tinham história de tratamento prévio de TB foram submetidos a teste de sensibilidade aos fármacos de primeira linha (Streptomycin Isoniazid Rifampicin Etambutol-BACTEC™). Os pacientes que apresentavam isolados resistentes à rifampicina e à isoniazida foram definidos como sendo portadores de TB multidrogarresistente (TB-MDR).<sup>4,9</sup>

Para efeito de análise, sempre que uma das técnicas indicasse resistência (MGIT960-BACTEC™ ou GeneXpertMTB/RIF®), o bacilo foi considerado resistente conforme recomendação da Organização Mundial da Saúde e de estudos comparativos entre o teste fenotípico e os testes moleculares.<sup>4,10</sup>

Resistência primária foi definida quando o bacilo havia sido isolado de pacientes sem história prévia aos fármacos anti-TB ou o utilizou em menos de 30 dias. A resistência secundária ou adquirida foi definida se o bacilo foi isolado de pacientes com exposição previa aos fármacos do tratamento da TB por um período maior ou igual a 30 dias, em algum momento da vida.

Os dados demográficos (idade e sexo) e sobre o *status* sorológico para o HIV foram recolhidos dos Registos de Notificação de Casos de Tuberculo-

se nos setores do PNCT da Cidade da Beira e no Serviço de Tisiologia do Hospital Central da Beira (HCB).

A análise dos dados demográficos e do resultado do HIV foram expressos como variáveis categóricas binárias, exceto a idade que foi expressa em variável contínua. Os resultados da cultura, teste de sensibilidade e TRM (GeneXpert) foram expressos em variáveis categóricas numéricas.

Foi utilizado o Stata/SE versão 13.0 para análise das variáveis. O nível de significância estatística foi determinado em  $p < 0.05$  e CI de 95%.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Bioética para Saúde (IRB00002656) do Ministério de Saúde de Moçambique e registado sob o número 82/CNBS/2014 e pelo IRB da Universidade de Pittsburgh PRO14120250.

**Apoio financeiro:** Este estudo foi apoiado em parte pelo Fogarty International Center, National Institutes of Health (D43TW009753, to the University of Pittsburgh).

## Resultados

Foram analisadas 87 amostras clínicas com cultura positiva no MGIT960-BACTEC™ e todas as amostras clínicas foram positivas no TRM (GeneXpert®).

Dos 87 pacientes incluídos no estudo, 43(49,4%) eram do sexo masculino e 44(50,6%) do sexo feminino. A média de idade dos pacientes estudados foi de 35 anos (variou de 13 a 69 anos). Na distribuição por faixa etária houve predomínio dos casos entre pessoas de 26 e 45 anos.

Do total de pacientes estudados 56,3% (49/87) fizeram sorologia para HIV e destes 61,2% (30/49) tinham diagnóstico de infecção pelo HIV confirmada.

Um total de 33 pacientes tinha TB resistente a alguma dos fármacos testados. Desses, 61,2% (20/33) eram coinfectados pelo HIV, enquanto que dos 54 pacientes com TB sensível 20,1% (13/54) estavam coinfectados.

Os fatores de risco para TB resistente, observados nos pacientes deste estudo foram: antecedente de tratamento de TB, contato prévio com pacientes que tiveram TB, ser profissional da saúde e ser infectado pelo HIV. (Tabela 1).

**Tabela 1. Frequência de fatores de risco para TB multidrogarresistente**

Fatores de Risco para TB-MR	<i>M. tuberculosis</i> Resistente Nº 33	<i>M. tuberculosis</i> Sensível Nº 54	Total Nº 87
TB Prévia	13	2	15
Contato com TB	17	20	37
Profissional de Saúde	2	0	2
Imunodepressão	1	5	6
Não identificado	0	27	27

Dos 87 isolados incluídos no estudo e analisados pelos dois testes que informam sobre a sensibilidade do bacilo (TRM e TS), 33 (37.9%) apresentaram algum tipo de resistência, enquanto que 54 (62.1%) não demonstraram qualquer resistência aos fármacos avaliados. Dos 33 isolados com resistência: 18 (54.7%) foram classificados como TB-MDR, ou sejam eram resistentes à RMP e à INH. Havia ainda 11 (33.3%) de bacilos que eram monorresistentes à INH e 2 (6%) monorresistentes à RMP. (Figura 1 )

Dentre os pacientes que tinham resistência à isoniazida (mono ou MDR) 42% também apresentaram resistência à estreptomocina(Sm).

Um paciente teve a resistência à rifampicina detectada pelo TRM, mas não detectada pelo teste fenotípico. Em cinco pacientes houve detecção de

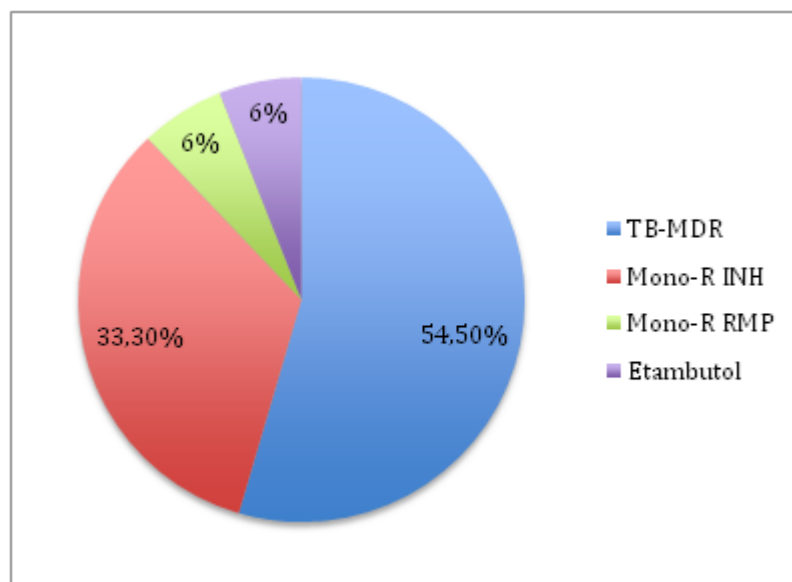
resistência à RMP no teste fenotípico e a mesma não foi detectada pelo TRM (GeneXpert®).

Em todos os isolados que tiveram a resistência a RIF e INH detectada pelo teste fenotípico, os respectivos pacientes tinham historia prévia de tratamento para TB, ou seja, eram casos de resistência adquirida ou secundária.

### Discussão

A idade media da população estudada foi de 35 anos ±17. Este achado justifica-se porque Moçambique é um país de população predominantemente jovem, onde mais de 50% da população tem menos de 25 anos.

A co-infecção pelo HIV foi maior nos pacientes com TB que tinham bacilo com algum tipo de



**Figura 1.** Frequência de Resistência às drogas avaliadas pelo teste rápido molecular (TRM) e pelo Teste Fenotípico

resistência aos fármacos de primeira linha (60%). Entre os pacientes com TB-MDR o percentual de coinfectados foi de 42,8%. Estes achados são similares aos de Burst et al. (2012) em estudo feito na África do Sul, um país Sub-sahariano e com carga de TB/HIV similar a de Moçambique.<sup>13</sup> Resultados similares aos da África do Sul também foram evidenciados no inquérito nacional de prevalência de resistência aos fármacos antiTB em Moçambique.<sup>8,14</sup> Este achado justifica-se pela vulnerabilidade ao desenvolvimento da resistência nos pacientes infectados pelo HIV, como foi visto no surto de TB-MDR e TB extensivamente resistente (TB-XDR) em Kwazulu-Natal na África do Sul em pacientes majoritariamente infectados pelo HIV.<sup>13</sup>

Nossos achados mostraram que todos os pacientes com TB resistente tiveram exposição previa aos fármacos antituberculosas em algum momento da sua vida. A proporção de TB-MDR em pacientes previamente expostos aos fármacos de primeira linha (resistência adquirida) foi maior 13/15(86,6%) do que aquela observada entre os não expostos 2/15(13,4%) (resistência primária). Os fatores de risco para TB multidrogarresistente encontrados neste estudo são semelhantes ao encontrados por Xu, B. et al. (2014), na China com uma amostra de 328 pacientes onde 77,8% dos portadores de TB-MDR tinham historia previa de tratamento da doença.<sup>11</sup> Embora alguns estudos que foram feitos em outros países da África Subsaariana mostraram uma frequência menor de TB-MDR em pacientes previamente tratados 27,2% (95% CI 21.4 – 33.8%) e 10.3 % (95% CI 5.8 – 17.4%).<sup>12</sup>

Observamos maior associação entre a resistência da INH e da Sm (42%) no grupo estudados. Existem relatos desta associação, especialmente se resistência à INH for de alto nível, ou seja com mutação no gene KatG no codon 315.<sup>15,16</sup> Esta informação é muito importante do ponto de vista prático, pois muitos esquemas de tratamento da TB resistente incluem a Sm como droga injetável de escolha.<sup>17</sup>

A porcentagem de resistência à INH encontrada foi de 51,4%, dentre os 33 isolados com algum tipo de resistência aos fármacos. Nossos achados são consistentes com os de Pires et al. (2014),

em um estudo feito usando dados da Beira-Moçambique onde obtiveram uma frequência de 65,7%.<sup>18</sup> Este achado pode justificar se pela ampla exposição à isoniazida que tem a população de infectados pelo HIV, que recebem INH para tratar a TB latente. Estudos prévios mostraram que apesar do impacto positivo do uso da INH no tratamento da TB latente, em países com elevados índices de transmissão da TB e fraca capacidade de diagnóstico da doença ativa, o uso massivo da INH pode propiciar o surgimento da resistência a esta droga se não descartada a doença em atividade.<sup>19, 20</sup>

Cerca de 5 a 15% dos indivíduos com TB latente irão desenvolver TB ativa em algum momento da vida caso não sejam tratados. Esta percentagem aumenta em casos de imunodepressão.<sup>21,22,23</sup> Churchyard et al., num estudo feito na África do Sul mostrou que em regiões com alta transmissão da TB, o tratamento em massa com INH em indivíduos infectados pelo HIV oferece benefício contínuo ao longo da vida.<sup>22</sup>

A Organização Mundial da Saúde recomenda o uso da INH por no mínimo nove meses para o tratamento da TB latente em países com elevadas taxas de transmissão da TB.<sup>22</sup> Golub JE. et al. num estudo feito no Brasil mostrou que apenas 6 meses de tratamento de TB latente com INH oferecem proteção a longo prazo.<sup>24</sup> Em Moçambique o uso da INH para o tratamento da TB latente em pacientes infectados pelo HIV, independentemente do grau de imunossupressão,<sup>7</sup> pode estar facilitando a ocorrência de resistência das cepas de *M. tuberculosis* se não for descartado a TB ativa.

Dentre as limitações do estudo merece atenção o fato de que um pequeno número de isolados de *M. tuberculosis* terem sido avaliados pelo teste fenotípico.

## Conclusão

Observa-se uma alta proporção de coinfeção HIV/TB entre pacientes portador de cepas do *M. tuberculosis* monorresistente ou MDR. Além de alta taxa de monorresistencia à isoniazida, e a associação entre resistência concomitante à INH e Sm.

## Referências

- Perrin P. Human and tuberculosis co-evolution: An integrative view. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015;95 Suppl 1:S112-6.
- Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K, Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 5:a017798.
- Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, Amaral EP, Barber DL, Gonzales J, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature (Lond.)*. 2014;511:99-103.
- WHO, 2014. Global tuberculosis report 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.
- World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Technical and operational 'How-to'. Practical considerations. WHO/HTM/TB/2011.2. Geneva: World Health Organization, 2011.
- MOÇAMBIQUE. Ministério da Saúde . Direção nacional de Saúde Pública. Relatório de Actividade desenvolvidas durante o ano 2014. Maputo, 2015.
- MAPUTO. Ministério da Saúde. Guia de tratamento antiretroviral e infecções oportunistas no adulto, adolescente, grávida e criança, 2014.
- Samo Gudo P, Cuna Z, Coelho E, Maungate S, Borroni E, Miotto P, et al. Is multidrug-resistant tuberculosis on the rise in Mozambique? Results of a national drug resistance survey. *Eur Respir J*. 2011;38:222-4.
- Salgame P, Geadas C, Collins L, Jones-López E, Ellner JJ. Latent tuberculosis infection - Revisiting and revising concepts. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015.
- Dlamini-Mvelase NR, Werner L, Phili R, Cele LP, Mlisana KP. Effects of introducing Xpert MTB/RIF test on multi-drug resistant tuberculosis diagnosis in KwaZulu-Natal South Africa. *BMC Infect Dis*. 2014;14:442.
- Xu B, Zhao Q, Hu Y, Shi Y, Wang W, Diwan VK. Experiences in anti-tuberculosis treatment in patients with multiple previous treatments and its impact on drug resistant tuberculosis epidemics. *Glob Health Action*. 2014; 7: p. 24593.
- Lukoye D, Ssengooba W, Musisi K, Kasule GW, Cobelens FG, Joloba M, et al. Variation and risk factors of drug resistant tuberculosis in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2015;15:291-16.
- Brust JC, Shah NS, Scott M, Chaiyachati K, Lygizos M, van der Merwe TL, et al. Integrated, home-based treatment for MDR-TB and HIV in rural South Africa: an alternate model of care. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012; p.998-1004.
- Zumla A, Chakaya J, Centis R, D'Ambrosio L, Mwaba P, Bates M, et al. Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *Lancet Respir Med*. 2015;3:220-34.
- van Doorn HR, de Haas PE, Kremer K, Vandenbroucke-Grauls CM, Borgdorff MW, van Soolingen D. Public health impact of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains with a mutation at amino-acid position 315 of katG: a decade of experience in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:769-75.
- van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of Mycobacterium tuberculosis in the Netherlands. *J Infect Dis*. 2000;182:1788-90.
- WHO, 2014. Companion handbook to the WHO Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. 2014. Geneva: World Health Organization, 2014.
- Pires GM, Folgosa E, Nquobile N, Gitta S, Cadir N. Mycobacterium tuberculosis resistance to antituberculosis drugs in Mozambique. *J Bras Pneumol*. 2014;40:142-7.
- Churchyard GJ, Fielding KL, Grant AD. A trial of mass isoniazid preventive therapy for tuberculosis control. *N Engl J Med*. 2014;370:1662-3.
- Churchyard GJ, Corbett EL, Kleinschmidt I, Mulder D, De Cock KM. Drug-resistant tuberculosis in South African gold miners: incidence and associated factors. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4:433-40.
- Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M. Latent Mycobacterium tuberculosis infection. *N Engl J Med*. 2015;372:2127-35.
- Akolo C, Adetifa I, Shepperd S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010:CD000171.
- Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;1:CD009593.
- Golub JE, Cohn S, Saraceni V, Cavalcante SC, Pacheco AG, Moulton LH, et al. Long-term protection from isoniazid preventive therapy for tuberculosis in HIV-infected patients in a medium-burden tuberculosis setting: the TB/HIV in Rio (THRIO) study. *Clin Infect Dis*. 2015;60:639-45.