



DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE RIFAMPICINA PARA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* PROCEDENTES DA TRÍPLICE FRONTEIRA BRASIL/PARAGUAI/ARGENTINA

Vivian Damares Figueiral (PIBIC-AF-IS/CNPQ/Uem), Hayalla Correa de Carvalho, Tamires Leite Valverde, Giovana Ferreira Costacurta, Prof. Dra. Regiane Bertin de Lima Scodro (Co-orientadora) Prof. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso (Orientadora) email: rfcardoso@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia – Microbiologia aplicada

Palavras-chave: Tuberculose, resistência, rifampicina

Resumo:

A tuberculose é um problema de saúde pública e engloba diversos fatores causadores da doença, tanto econômicos quanto sociais. A doença é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e a grande preocupação nos dias atuais deve-se a sua resistência aos fármacos utilizados no tratamento. A concentração inibitória mínima (CIM) permite conhecer a menor concentração de rifampicina (RIF) que impede o crescimento bacteriano. Para tanto, realizou-se o ensaio de REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate) para determinar a CIM da cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv e de isolados clínicos disponibilizados Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR). Os ensaios realizados demonstraram que todos os isolados testados são sensíveis ao fármaco testado.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA, 2005). A TB acomete principalmente os pulmões (TB pulmonar), mas também pode ocorrer em outros órgãos (TB extrapulmonar). O Brasil está entre os países com maior





incidência de infecção e milhares de casos são conhecidos a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O motivo para a manutenção da doença nos dias de hoje se deve principalmente ao abandono do tratamento pelos pacientes que então continuam como fonte transmissora da doença para outros indivíduos, e agrava-se o quadro epidêmico (SOUZA, 2005). O tratamento convencional recomendado pelo Ministério da Saúde é realizado com a combinação de quatro fármacos: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (ETB), sendo 2 meses com os quatro e mais 4 meses com INH e RIF. Um dos principais medicamentos para a realização do controle da TB é a RIF (HIJJAR E PROCÓPIO, 2006). A resistência a RIF é mais frequente quando associada a outros medicamentos, como a INH (ROSSETI et al, 2002). O objetivo desse trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de RIF para isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes da tríplice fronteira Brasil-Paraguai-Argentina.

Materiais e métodos

Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram cedidos pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR) e recebidos em meio Lowenstein-Jensen (BBL™– Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA). A cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv e os 26 isolados clínicos foram inicialmente semeados em meio Lowenstein-Jensen e incubadas a 35°C para confirmar a pureza do crescimento bacteriano. Após 15 dias de crescimento, as bactérias foram repicadas para o meio de cultura Middlebrook 7H9 (BBL™– Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) suplementado com OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase) (BBL™– Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) e incubadas a 35°C por 15 dias.

A RIF utilizada, foi preparada a uma concentração de 400 µg/mL. Para o ensaio de REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate), em uma microplaca de 96 poços, foram depositados 100 µL de água estéril nas cavidades laterais da placa, a fim de evitar a evaporação durante a incubação. Nas demais cavidades foram adicionados 100 µL de meio de cultura 7H9 enriquecido com OADC. Nas cavidades da segunda coluna de cada placa adicionou-se uma solução de 1 µg/mL de RIF diluída em 7H9 suplementado com OADC. Foi então realizada uma diluição seriada até as cavidades da coluna 9. Para cada isolado clínico foram realizadas duplicatas do ensaio em dias diferentes. O crescimento bacteriano com 15 e 21 dias foi





padronizado conforme a escala 1 de McFarland e em seguida realizado uma diluição 1:20. Esta suspensão bacilar (100 μ L) foi adicionada a cada cavidade. Um controle de crescimento bacteriano e um controle de esterilidade do meio de cultivo foram incluídos para cada ensaio. A placa foi tampada e incubada a 37 °C em atmosfera normal. Após 7 dias de incubação, 30 μ L de solução recém preparada de resazurina 0,01 % foi adicionado a cada cavidade e a placa foi incubada por mais 24 horas. Uma mudança de cor azul para rosa indicou o crescimento de bacteriano, e a CIM foi definida como a menor concentração do fármaco em teste que evitou a mudança de cor. As concentrações de RIF usadas nos testes variaram de 0,015 μ g/mL a 0,250 μ g/mL

Resultados e Discussão

As CIM encontradas para os 26 isolados clínico e a cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv estão descritas na tabela 1. Os isolados clínicos apresentaram CIM para RIF de 0,12 μ g/mL (12 isolados), CIM de 0,06 μ g/mL (13 isolados) e CIM de 0,25 μ g/mL (1 isolado). Os resultados mostraram que não houve cepas resistentes a RIF, o que corrobora com os dados da literatura ao explicar que a resistência ao fármaco de forma isolada é pouco comum (ROSSETI et. al., 2002).

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fármaco rifampicina contra isolados clínicos e a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Isolados clínicos/cepa padrão	CIM rifampicina (μ g/mL)	Perfil de sensibilidade a Rifampicina
H ₃₇ Rv, F1, F6, F7, F16, F20, F22, F23, F25, F29, F35, F42, F48, F52	0,06	Sensíveis
F2, F4, F8, F10, F14, F21, F26, F32, F33, F36, F38.F51.	0,12	Sensíveis
F44	0,25	Sensível





Conclusões

Considerando o valor de referência para resistência de *M. tuberculosis* para a RIF $\geq 0,50 \mu\text{g/mL}$, os isolados clínicos provenientes da fronteira Brasil-Paraguai-Argentina não possuem resistência ao fármaco testado.

Agradecimentos

Ao CNPQ e PPG/UEM.

Referências

HIJJAR, M. A.; PROCÓPIO M. J. Tuberculose - epidemiologia e controle no Brasil. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 2, p. 15-23, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tuberculose. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/tuberculose>>. Acesso em: 20 maio 2016.

ROSSETTI, M. L.; VALIM, A. R.; SILVA, M.S.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev Saude Publica**, v. 36, n. 4, p. 525-532, 2002.

SOUZA, M. V. N. de. Rifampicina, um importante fármaco no combate à tuberculose. **Rev. Bras. Farm**, v. 86, n. 3, p. 92-94, 2005.

