



APLICAÇÃO DA METODOLOGIA *RESAZURIN MICROTITER ASSAY PLATE (REMA)* PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ISONIAZIDA CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

Tamires Leite Valverde, Hayalla Côrrea de Carvalho, Giovana Ferreira Costacurta, Vivian Figueiral, Regiane Bertin de Lima Scodro (Coorientadora), Rosilene Fressatti Cardoso (Orientadora) e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá Centro de Ciências da Saúde/Maringá-PR

Microbiologia- Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Tuberculose, Isoniazida, isolados clínicos

Resumo

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A Isoniazida é um fármaco usado no tratamento da TB, com ação bactericida nos bacilos em multiplicação. O objetivo deste trabalho foi determinar o valor da concentração inibitória mínima de INH, utilizando o método *Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA)*, contra os isolados clínicos de *M. tuberculosis* procedentes da tríplice fronteira Brasil/Paraguai/Argentina que apresentam resistência a pelo menos um dos fármacos, usados na terapia da doença, pelo método *Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT)*®. Dos 29 isolados clínicos analisados, 6 apresentaram CIM de 0,01 µg/mL, 15, CIM de 0,03 µg/mL, 3, CIM de 0,06 µg/mL, 3, CIM de 2 µg/mL e 2, CIM de 4 µg/mL.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Estima-se que sua incidência seja de 9,6 milhões de casos por ano em todo o mundo (OMS, 2014). Ela é transmitida de forma aérea, pela liberação de bacilos na tosse, fala ou espirro de pessoas doentes. A Isoniazida (INH) é um derivado sintético do ácido isonicotínico, utilizada desde 1952. INH tem ação bactericida nos bacilos em





multiplicação, mas tem pouca ação sobre os bacilos de crescimento lento ou em latência. A concentração inibitória mínima (CIM) de INH contra *M. tuberculosis* varia de 0,02 a 0,20 µg/mL (ARBEX et al, 2010). *M. tuberculosis* pode se tornar resistente aos fármacos nos casos em que a terapia não é seguida adequadamente. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi determinar o valor da concentração inibitória mínima de Isoniazida, contra os isolados clínicos de *M. tuberculosis* procedentes da tríplice fronteira Brasil/Paraguai/Argentina que apresentam resistência a pelo menos um dos fármacos, usados na terapia da doença, pelo método *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT)®.

Materiais e métodos

Vinte e nove isolados clínicos e a cepa padrão H₃₇Rv de *M. tuberculosis* (ATCC 27294) utilizados nesta pesquisa, foram cedidos pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR). Esses foram recebidos em meio Lowenstein-Jensen (L-J), então semeados em meio de cultura Middlebrook 7H9 e incubados a 35 °C por 15 dias. A CIM para os isolados clínicos de *M. tuberculosis*, de INH, foi determinada pelo método REMA utilizando Resazurina como agente revelador em microplacas de 96 orifícios (Kartell, Milão, Itália) em triplicata como previamente descrito por Palomino *et al.* (2002). Inicialmente a INH foi diluída com Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, nos orifícios das microplacas e após adicionado 100 µl do inóculo bacteriano previamente padronizado obtendo-se diluições finais de 2 µg/mL – 0,0156 µg/mL de INH. As microplacas foram seladas e incubadas a 36°C em atmosfera normal por 7 dias. Após, 30µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) recém preparada foram adicionados a cada orifício e as placas foram re-incubadas a 36°C por 24h para posterior leitura visual. A mudança da cor azul para rosa pela redução da resazurina foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para cada isolado estudado foi utilizado um orifício contendo inóculo micobacteriano e meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC como controle de crescimento e outro orifício contendo apenas meio de cultivo Middlebrook 7H9 como controle de esterilidade do meio de cultivo.

Resultados e Discussão





Dos 29 isolados clínicos testados para determinação de CIM para INH, 6, tiveram CIM de 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 15, CIM de 0,03 $\mu\text{g/mL}$, 3, CIM de 0,06 $\mu\text{g/mL}$, 3 CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$ e 2, CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Os isolados que tiveram CIM $\geq 0,2$ foram considerados resistentes ao fármaco, totalizando 5 isolados clínicos de *M. tuberculosis*. A CIM de INH para a cepa padrão H₃₇Rv foi de 0,06 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fármaco Isoniazida frente aos isolados clínicos e cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis*

Isolados clínicos/cepa padrão	CIM Isoniazida ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil de sensibilidade à Isoniazida	Isolados clínicos/cepa padrão	CIM Isoniazida ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil de sensibilidade à Isoniazida
H37Rv	0,06	S	F23	2	R
F1	0,03	S	F25	0,03	S
F2	0,03	S	F26	2	R
F4	4	R	F29	0,01	S
F5	0,03	S	F32	0,06	S
F6	0,01	S	F33	0,03	S
F7	0,03	S	F35	0,03	S
F8	0,01	S	F38	0,01	S
F10	0,03	S	F42	0,03	S
F12	4	R	F44	0,03	S
F14	2	R	F47	0,06	S
F19	0,03	S	F48	0,03	S
F20	0,01	S	F51	0,06	S
F21	0,03	S	F52	0,03	S
F22	0,01	S	F56	0,03	S

S: Sensível; R: Resistente

Segundo Rossetti *et al.* (2002), a maioria dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH estão relacionados com mutações nos genes que codificam enzimas responsáveis pela metabolização do fármaco. Com base nos modelos *in vitro* e *in vivo*, atualmente compreende-se bem as particularidades da multiplicação diferenciada do *M. tuberculosis*, conforme a oferta de oxigênio. Isto é, distintas velocidades de crescimento nos meios intra e extracelulares, nas lesões caseosas fechadas, e nas paredes das lesões cavitárias. Com isso se diferenciam populações de multiplicação geométrica (mais sensíveis à ação dos medicamentos) daquelas persistentes (multiplicação lenta ou intermitente), que exigem tempo prolongado de uso dos medicamentos para sua eliminação. Assim se





fundamentam as bases terapêuticas da associação medicamentosa para neutralizar os bacilos naturalmente resistentes, e do tempo longo de tratamento para eliminação dos persistentes, como ocorre nas formas resistentes. Bacilos contendo mutações que levam resistência a INH são favorecidos quando o tratamento não é seguido de forma correta, ou seja, muitas vezes os pacientes acabam desistindo da terapia, já que para se obter a cura são necessários no mínimo 6 meses de tratamento. Isto favorece a seleção de bacilos resistentes a um ou mais fármacos.

Conclusões

A maior parte dos isolados clínicos foram sensíveis ao fármaco. Apenas 17,2 % dos isolados foram resistentes à Isoniazida.

Agradecimentos

Ao CNPq.

Referências

ARBEX M.A., VARELLA M.C, SIQUEIRA H.R., MELLO F.A., Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs, in: **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brazil, 2010, pp. 626-640.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. August 2002 vol. 46 n. 8, p. 2720-2722, 2002.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. d. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S., Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista Saúde Pública**, v. 36 n. 4, p. 525-532, 2002.

WHO. **Tuberculosis**, 2014. Disponível em: http://www.who.int/gho/tb/epidemic/cases_deaths/en/. Acesso em: 10/05/2016

