

AVALIAÇÃO DA AÇÃO *in vitro* EM pH ÁCIDO DE LINEZOLIDA E LEVOFLOXACINO EM *Mycobacterium tuberculosis*

Liliani Aparecida Ferreira da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Nathally Claudiane de Souza Santos, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Regiane Bertin de Lima Scodro, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: liliani.ferreira3@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas III / Microbiologia / Bacteriologia

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, REDCA, pH ácido

Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que continua sendo um importante problema de saúde pública mundial. Com o crescente aumento de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes (MDR) e extensivamente resistente (XDR) à fármacos anti-TB, elevou-se a busca por outras opções de tratamento. Entre os fármacos para tal estão as fluoroquinolonas (levofloxacino (LVX), moxifloxacino), linezolida (LNZ), amoxicilina-clavulanato, claritromicina, tioridazina e clofazimina. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade *in vitro* dos fármacos PZA, LNZ e LVX na cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv e isolados clínicos em condição de pH 6,0. A utilização de LNZ e LVX mostrou-se eficaz contra *M. tuberculosis* comparando suas ações com PZA nos isolados de *M. tuberculosis* testados. Novos estudos devem ser realizados sobre a interação desses fármacos com os de primeira escolha para o tratamento da TB.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana crônica, infectocontagiosa, de distribuição universal causada, principalmente, pelo bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*. Atualmente, o tratamento recomendado para os novos casos de TB consiste no uso por dois meses de isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), seguido de quatro meses com INH e RIF. O controle da TB está severamente comprometido pelo surgimento de novas linhagens de *M. tuberculosis* multirresistente (MDR) e extensivamente resistente (XDR). A busca por novos fármacos para o tratamento da TB-MDR e TB-XDR, incluem a aplicação de fluoroquinolonas (levofloxacino (LVX), moxifloxacino), linezolida (LNZ), amoxicilina-clavulanato, claritromicina, tioridazina e clofazimina (WHO 2017). Assemelhando-se a condições intramacrofágicas, durante a fase de multiplicação bacilar na evolução da doença (Njire, M. et al, 2016) é importante investigar a ação de fármacos não somente em pH neutro, como ocorre na maioria dos testes, mas também em pH ácido.

Este estudo determinou a concentração inibitória mínima (CIM) de PZA, LNZ e LVX, *in vitro*, em pH 6,0 em *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) e em isolados clínicos resistentes a fármacos anti-TB.

Materiais e métodos

Preparo de meio de cultura

Para manutenção da cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos de *M. tuberculosis* 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) foi preparado conforme as instruções do fabricante.

A determinação da concentração inibitória mínima em pH ácido, foi utilizado o meio Middlebrook 7H9 com pH 6,0 ajustado com HCl.

Preparo da solução estoque de fármacos

As soluções estoque de PZA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e INH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), fármacos usados como referência, foram preparadas nas concentrações 12800 µg/mL e 10000 µg/mL, respectivamente e armazenadas a - 20 °C. Os fármacos LVX (HalexIstar Co, Goiania, GO, Brasil) e LNZ (Zyvox®, Pfizer, Brasil) foram preparadas nas concentrações 5000 µg/mL e 2000 µg/mL, respectivamente, e armazenados nas mesmas condições acima citada.

Manutenção da cepa de referência Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv e isolados clínicos

Foram utilizados a de cepa de referência H₃₇Rv (ATCC 27294) e isolados clínicos de *M. tuberculosis*, da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, cultivados em meio líquido Middlebrook 7H9 e incubada por 15 - 21 dias a 35 °C ± 2 antes da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em pH 6,0

A determinação da (CIM) foi realizada utilizando o método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA), conforme descrito por Palomino *et al.*, 2002. sob a condição de pH ácido (6,0). O crescimento bacteriano foi padronizado visualmente de acordo com a escala 1 de McFarland. Neste ensaio, utilizou-se uma microplaca de 96 cavidades onde nas cavidades laterais da placa, adicionou-se 200 µL de água destilada para manter umidade no experimento. Na coluna 11, foram colocados 200 µL do meio Middlebrook 7H9 pH 6,0, sem adição de fármacos ou bactéria (controle de esterilidade do meio de cultura). Na coluna 10 foram adicionados 100 µL de meio Middlebrook 7H9 pH 6,0 e 100 µL do inóculo bacteriano (controle de crescimento bacteriano). Nas demais cavidades foram adicionados 100 µL de Middlebrook 7H9 pH 6,0 e cada fármaco foi adicionado à coluna 2 realizando diluições seriadas até a coluna 9. As diluições utilizadas foram de 3200 – 3,125 µg/mL para PZA, 16,0 – 0,062 µg/mL para LVX e de 16,0 – 0,031 µg/mL para LNZ. Após, 100 µL do inóculo

bacteriano, padronizado e diluído 1:20, foi acrescentado a todas as cavidades, com exceção da coluna 11. A placa foi coberta com uma tampa de acrílico e incubada por 7 dias a 35 °C. No sétimo dia de incubação, foi adicionado 30 µL da solução de resazurina a 0,02 % em cada cavidade da placa, e esta foi incubada por mais 24 horas. Na leitura da placa, a mudança da cor azul para rosa indicou o crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, que apresentou coloração azul.

Resultados e Discussão

A terapia recomendada para TB é baseada no uso de combinações de fármacos e em tempo prolongado para eliminar o bacilo em seus diferentes estágios do desenvolvimento da doença. Porém, o esquema terapêutico padrão (INH, RIF, EMB e PZA) em situações de monorresistência, MDR-TB ou XDR-TB, não atinge o efeito desejado (WHO 2017).

Os valores das CIMs dos fármacos PZA, LNZ e LVX em pH 6,0, para cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos encontram-se na Tabela I. Em nosso estudo, LNZ e LVX isoladamente apresentaram atividade contra *M. tuberculosis* em pH 6,0 e com valores de CIMs inferiores aos encontrados para PZA. A CIM variou entre 100-3.200 µg/mL para PZA, 0,25-4 para LVX e para LNZ todas foram equivalente a 0,25 µg/mL

Tabela I. Concentração inibitória mínima de linezolida e levofloxacino em *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e isolados em pH 6,0.

Isolados	Perfil de Sensibilidade	CIM (µg/mL)		
		PZA	LNZ	LVX
H ₃₇ Rv*	Sensível	100	0,25	0,5
73A	INH, RIF, PZA	3.200	0,25	4
309	INH, RIF, SM	100	0,25	0,5
3614	PZA, INH, RIF, EMB, SM, ETH	3.200	0,25	1
109	INH, RIF	800	0,25	0,25

*Cepa de referência *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294); CIM: Concentração Inibitória Mínima; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; LVX: levofloxacino; EMB: etambutol; SM: estreptomicina; ETH: etionamida; LNZ: linezolida.

O fármaco LVX pertence à classe fluoroquinolona e atua inibindo a replicação do DNA bacteriano. LVX possui excelente atividade contra linhagens de *M. tuberculosis* comparado a outros medicamentos da mesma classe onde alguns estudos mostram que a utilização de LVX no tratamento de pacientes com TB-MDR resultou em maior eficácia bem como os estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram atividade contra *M. tuberculosis* de duas a três vezes maior que ofloxacino (Rodriguez Díaz JC et al, Rastogi N et al, 1996).

LNZ que pertence a classe das oxazolidinonas, é um fármaco inibidor da síntese de proteínas bacteriana e possui amplo espectro de ação contra

micro-organismos Gram-positivos, incluindo multirresistentes. LNZ mostrou ter atividade precoce em pacientes com TB pulmonar, incluindo TB-MDR e TB-XDR em pesquisas realizadas *in vivo* combinado a fármacos de primeira linha em *M. tuberculosis* corroborando com os achados deste estudo (Rodríguez Díaz JC et al, 2003; Zhao W et al, 2016). O presente resultado chama atenção para continuidade dos estudos e uso destas combinações no tratamento de pacientes com TB-MDR.

Conclusões

As CIM de LNZ e LVX contra *M. tuberculosis* apresentaram valores bem inferiores aos obtidos com PZA. Neste sentido, novos estudos devem ser conduzidos no uso destes no combate ao bacilo.

Agradecimentos

Aos colaboradores do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. A Fundação Araucária pela bolsa concedida para que este estudo fosse possível.

Referências

- Alsultan A, An G, Peloquin CA. *Limited Sampling Strategy and Target Attainment Analysis for Levofloxacin in Patients with Tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(7):3800–3807.
- Njire, M., Tan, Y., Mugweru, J., Wang, C., Guo, J., Yew, W., Tan, S., Zhang, T, 2016. *Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: review and update. Adv. Med. Sci.* 61, 63-71.
- Palomino JC, 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 and chemotherapy.* 2002; 46(8):2720-2.
- Rastogi N, Goh KS, Bryskier A et al. *In vitro activities of levofloxacin used alone and in combination with first- and second-line antituberculosis drugs against Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40:1610-6.
- Rodríguez Díaz JC, Ruiz M, López M, Royo G. *Synergic activity of fluoroquinolones and linezolid against Mycobacterium tuberculosis. Int J Antimicrob. Agents.* 2003; 21:354–6.
- WHO. *Global Tuberculosis Report. World Health Organization*, 2017. <[HTTP://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/)>. Acesso em: 20 jul. 2018.
- Zhao W, Zheng M, Wang B, Mu X, Li P et al. *Interactions of linezolid and second-line anti-tuberculosis agents against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo. International Journal of Infections Diseases.* 2016; 52:23-28.