

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ESTREPTOMICINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*

Renata Alexandre de Oliveira¹ (PIC/CNPq/FA/UEM), Giulienne Karla Pereira da Silva¹, Regiane Bertin de Lima Scodro¹, João Vítor Perez de Souza¹; Letícia Sayuri Murase¹, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli¹ (Orientador), e-mail: katianyrcf@gmail.com.

¹Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR

Área e subárea: Ciências Biológicas III, Microbiologia.

Palavras-chave: Estreptomicina, tuberculose, resistência antimicrobiana.

Resumo

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. A progressão acentuada da TB reforça a necessidade de estudos que proponham o controle de bacilos multirresistentes. Dentre as estratégias disponíveis, a reutilização de fármacos como a estreptomicina (SM) se mostra necessária. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de SM em 10 isolados clínicos de *M. tuberculosis* pertencentes à micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica. A CIM de SM para cada bactéria foi determinada por meio do método *resazurin microtiter plate assay* (REMA). A CIM de SM variou de 0,25 até 2 µg/mL para os isolados testados, caracterizando três isolados como resistentes e sete como sensíveis. A proporção de resistência e susceptibilidade a SM está de acordo com a literatura. Nossos resultados evidenciam a possibilidade da reutilização da SM no esquema padrão de tratamento da TB, no entanto um maior número de isolados clínicos deverá ser estudado para melhor compreensão da diminuição da resistência bacteriana ao longo dos anos contra este fármaco.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. O desenvolvimento da doença depende de fatores ligados ao próprio hospedeiro, como estado nutricional e imunitário, e fatores ambientais como ocupação profissional e exposição a aglomerados humanos. Estima-se que em 2017 foram gastos mundialmente 9,2 bilhões de dólares com a TB, excluindo os gastos com pesquisas sobre a doença. Em 2017 ocorreram 1,7 milhões de mortes por TB (WHO, 2018) e o Brasil encontra-se entre os 22 países que concentram 80% dos casos estimados de TB no mundo (WHO, 2018).

O tratamento da TB visa à cura rápida a fim de reduzir a transmissão da doença. Os fármacos utilizados no tratamento atual são classificados em fármacos

de primeira e segunda escolha de acordo com a sua eficácia, atividade e o risco de produzir reações adversas. De forma geral, os fármacos de segunda linha são mais tóxicos e podem ser menos eficientes no combate ao *M. tuberculosis* (WHO, 2018).

Apesar de eficiente, o tratamento da doença pode se estender caso o bacilo apresente resistência a um dos fármacos empregados. Características como envelope celular altamente impermeável; ação de bombas de efluxo e enzimas hidrolíticas (ex: aminoglicosídeo acetil-transferases) fazem com que as micobactérias sejam naturalmente resistentes.

A longa exposição de *M. tuberculosis* aos fármacos do esquema básico gera uma pressão seletiva para mutantes resistentes. O mecanismo de resistência a estreptomicina (SM) ocorre principalmente por mutações na subunidade ribossomal S12 (*rpsI*), responsável por codificar um dos sítios alvo da SM. Outra mutação comum ocorre em duas regiões diferentes dos genes que codificam o RNA 16S (*rrs*) (ROSSETI, M.L.R, et al, 2002).

A partir do exposto, tornou-se importante o estudo da resistência aos fármacos antituberculosos como a SM, com a finalidade de melhor aproveitar os recursos antibióticos existentes bem como embasar pesquisas acerca do desenvolvimento de novas combinações de fármacos como possíveis alternativas ao esquema de tratamento atual da TB.

Materiais e métodos

Dez isolados de *M. tuberculosis* com diferentes perfis de sensibilidade aos antimicrobianos pertencentes à micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica (LEPAC-UEM) foram selecionados para este estudo. As culturas bacterianas foram mantidas em meio líquido em Middlebrook 7H9 suplementado em 10 % com OADC a temperatura de 35 °C por 15 – 21 dias.

A concentração inibitória mínima (CIM) de SM para cada isolado clínico de *M. tuberculosis* foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* (REMA), técnica descrita por Palomino et al (2002), utilizando uma microplaca de 96 orifícios. Resumidamente, a técnica baseia-se em uma microdiluição de fármacos em meio de cultura. Após adição de inóculo micobacteriano padronizado, a placa foi incubada por sete dias a 35 °C. Em seguida, foi adicionado resazurina (0,03%) e a leitura foi feita após 24 horas. Utilizou-se também INH como um controle do ensaio. A mudança da cor azul para rosa pela redução da resazurina foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir a mudança de cor da resazurina de azul para róseo.

Resultados e discussão

Dez isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram submetidos ao ensaio REMA. Assim, obtivemos os seguintes resultados: a CIM de SM variou de 0,25 até 2 µg/mL, caracterizando três isolados como resistentes e sete como sensíveis; para INH, o valor de CIM nos isolados testados variou de 0,007 até 0,25 µg/mL.

A alta frequência de isolados sensíveis a SM encontrada (7/10) possivelmente se deve ao fato que a SM foi retirada do esquema padrão de tratamento da TB. Assim, mutantes resistentes são selecionados com menos

frequência. Porém, é importante ressaltar que o número de isolados clínicos testados representa uma pequena fração da totalidade.

Apesar de baixas CIMs de SM terem sido observadas, este fármaco apresenta toxicidade mais elevada e via de administração intravenosa, conseqüentemente mais complexa, do que os fármacos de primeira escolha no tratamento da TB (Arbex et al., 2010). Deste modo, o uso da SM fica reservado para casos de doença causada por *M. tuberculosis* resistente ou em que a terapia padrão não se mostre eficaz.

Segundo Pires et al. 2007, a importância da utilização e monitoramento do padrão de sensibilidade/resistência dos antimicrobianos frente aos microrganismos cresce diante das falhas no tratamento que, na maioria das vezes, é empírico; no entanto, a orientação de uma nova conduta terapêutica favorece o sucesso na terapia. O crescente aumento de bactérias resistentes a vários antimicrobianos representa um enorme desafio aos profissionais da área da saúde no tratamento das infecções, necessitando, portanto, de revisões e análises periódicas.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de SM e INH de isolados clínicos de *M. tuberculosis* selecionados neste estudo.

Isolados clínicos	Perfil de susceptibilidade	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)	
		Estreptomicina	Isoniazida
07	SM ^R	1,00	0,03
24	S	0,25	0,06
26	S	0,25	0,25
56	S	0,25	0,03
82	SM ^R	2,00	0,03
83	S	0,5	0,015
87	SM ^R	2,00	0,03
91	S	0,25	0,03
1193	S	0,25	0,007
3614	INH ^R ; RIF ^R ; EMB ^R	0,5	0,03

S, sensível; INH^R, resistente a isoniazida, RIF^R resistente a rifampicina, EMB^R resistente a etambutol.

Conclusões

Considerando que a CIM do fármaco SM para a maioria dos isolados clínicos estudados permaneceu baixa, demonstrando que este fármaco ainda possui boa atividade contra *M. tuberculosis*. Nosso estudo evidencia a possibilidade da reutilização da SM no esquema padrão de tratamento da TB, no entanto um maior número de isolados clínicos deverá ser estudado para melhor compreensão da diminuição da resistência bacteriana ao longo dos anos contra este fármaco.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária (FA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; SIQUEIRA, H.R.; MELLO, F.A.F. drogas antituberculose: **Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais**. Parte 1: fármacos de primeira linha. J BrasPneumol., v. 36, n. 5, 2010. p. 626-640.

PALOMINO, J.C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, 2002. p. 2720-2722.

PIRES M. C. S., FROTA K. S., MARTINS P. O. JR, CORREIA A. F., CORTEZ-ESCALANTE J.J., SILVEIRA C.A. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2007.

ROSSETI, M. L. R; VALIM, A.R.M; SILVA, M.S.N; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev. Saúde Pública vol.36** no.4 São Paulo, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global tuberculosis report 2018**. World Health Organization, 2018.