

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

PAULA ALINE ZANETTI CAMPANERUT

Detecção rápida de resistência a pirazinamida em *Mycobacterium tuberculosis*
pelo método em microplaca utilizando resazurina (REMA - Resazurin Microtiter
Assay)

Maringá
2010

PAULA ALINE ZANETTI CAMPANERUT

Detecção rápida de resistência a pirazinamida em *Mycobacterium tuberculosis*
pelo método em microplaca utilizando resazurina (REMA - Resazurin Microtiter
Assay)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicada à Farmácia do Departamento de Análises
Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia Aplicada à Farmácia

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Farmácia

Orientador: Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso

Maringá

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Campanerut, Paula Aline Zanetti

C186d Detecção rápida de resistência a pirazinamida em
Mycobacterium tuberculosis pelo método em microplaca
utilizando resazurina (REMA - Resazurin Microtiter Assay).
/ Paula Aline Zanetti Campanerut. -- Maringá, 2010.

37 f. : tabs.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Rosilene Fressatti Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas
à Farmácia, 2010.

1. *Mycobacterium tuberculosis* - Resistência. 2.
Tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) - Resistência -
Pirazinamida. 3. REMA (Resazurin Microtiter Assay). 4.
Pirazinamida - Detecção de resistência. I. Cardoso,
Rosilene Fressatti, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas
à Farmácia. III. Título.

CDD 21.ed. 616.995

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA ALINE ZANETTI CAMPANERUT

Detecção rápida de resistência a pirazinamida em *Mycobacterium tuberculosis* pelo método em microplaca utilizando resazurina (REMA - Resazurin Microtiter Assay)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Profª Drª Rosilene Fressatti Cardoso
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profª Drª Jane Marta Graton Mikcha
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Drª. Eliana Valéria Patussi
Universidade Estadual de Maringá

Profª. Drª. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Jorge Juarez Vieira Teixeira
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 02 de fevereiro de 2010.

Local de defesa: Bloco 126, Centro de Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio e amor incondicional, por todas as vezes que me encorajaram nas horas difíceis e me aplaudiram nos momentos de glória.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu eterno amor e misericórdia, por me mostrar o caminho certo nas horas difíceis e suprir todas as minhas necessidades;

Aos meus pais, Jair e Fatima, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim. Obrigada por acreditarem na minha capacidade! Sem o apoio e o exemplo de vocês eu não conseguiria esta conquista;

A minha irmã Franciane e meu cunhado Robson, pela hospedagem em São Paulo durante uma disciplina do mestrado, e acima de tudo, pelo apoio e incentivo;

A minha irmã Natalia por sua amizade e dedicação. Obrigada pelas vezes que me fez companhia no laboratório durante os fins de semana;

Ao meu namorado Junior pelo apoio, compreensão, amor e carinho. Por todas as vezes que me acompanhou até o laboratório em pleno domingo. Obrigada! Você é muito companheiro!

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso, pelos ensinamentos científicos e de vida, por sua dedicação e confiança transmitidos no decorrer desses sete anos de convivência. Muito obrigada pelas oportunidades que me ofereceu e por sempre acreditar em minha capacidade.

As minhas eternas amigas de faculdade e mestrado Fernanda e Luciana por me ajudarem nos experimentos e principalmente, por terem me encorajado nos momentos mais difíceis dessa caminhada, a amizade de vocês foi muito importante para realização desse sonho;

As bioquímicas Rubia, Elisa e Sônia pela paciência e por todos os ensinamentos durante os sete anos de estágio/mestrado no Laboratório de Bacteriologia Clínica;

As técnicas Maria, Edilene, Soninha, e ao Marcos, pelo carinho e colaboração durante a realização dos experimentos;

As professoras Regiane e Vera pelos ensinamentos, apoio e incentivo dispensados;

As alunas de pós-graduação Sara, Rosangela, Gabriela e Claudia pela colaboração e ajuda durante os experimentos;

A Prof^a Dr^a Daisy Nakamura Sato pelo auxílio e sugestões que contribuíram na realização deste trabalho;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas; E dela se serve para acalmar as dores e curá-las; O farmacêutico faz misturas agradáveis, compõem unguentos úteis a saúde, E seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra” (Eclo 36, 6-8)

Detecção rápida de resistência a pirazinamida em *Mycobacterium tuberculosis* pelo método em microplaca utilizando resazurina (REMA - Resazurin Microtiter Assay)

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença crônica causada por bacilos pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de quase ter sido erradicada em países desenvolvidos, a TB continua sendo um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. A pirazinamida (PZA) é um pró-fármaco utilizado no tratamento da TB, que requer conversão à sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), pela enzima pirazinamidase (PZase), que é codificada pelo gene *pncA*. Embora o mecanismo de ação do POA permaneça desconhecido, tem sido sugerido que o seu acúmulo em pH ácido, pode interromper o potencial de membrana do bacilo, afetando o transporte de nutrientes. A detecção precoce da resistência aos fármacos é muito importante para o controle da tuberculose e para o início do tratamento adequado. No entanto, o método das proporções em Lowenstein-Jensen (L-J), rotineiramente utilizado no Brasil para detecção de resistência em *M. tuberculosis* é trabalhoso, demanda tempo para obtenção dos resultados, além de possuir baixa reprodutibilidade em pH baixo, necessário para realização do teste contendo PZA. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi padronizar e avaliar o uso da Técnica em microplaca utilizando Resazurina como agente revelador (REMA) para detecção de resistência à PZA em *M. tuberculosis*. O resultado deste trabalho está no artigo: “Aplicação do método em microplaca utilizando resazurina (REMA- Resazurin Microtiter Assay) para detecção de resistência em *Mycobacterium tuberculosis*”, que mostra como o método REMA proposto pode contribuir para a detecção rápida de resistência a PZA em *M. tuberculosis*, por uma técnica rápida, sensível e específica.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Pirazinamida; REMA.

Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* by Resazurin Microplate Assay (REMA)

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic disease caused by an Acid Fast bacilli belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Despite having almost been eradicated in developed countries, TB remains a major public health problem, especially in developing countries. Pyrazinamide (PZA) is a pro-drug used to treat TB, which requires conversion to its active form, pirazinóico acid (POA), by the pyrazinamidase enzyme (PZase), encoded by the *pncA* gene. Although the mechanism of action of POA remains unknown, it has been suggested that their accumulation in acidic pH, can disrupt the membrane potential of the bacillus, affecting the transport of nutrients. Early detection of drug resistance is very important for TB control and the beginning of treatment. However, the proportion method in Lowenstein-Jensen (LJ), that is routinely used in Brazil for detecting resistance in *M. tuberculosis* is laborious, time-consuming and have low reproducibility at acid pH that is necessary to perform the test with PZA. Thus, the purpose of this study was standardize and evaluate the use of resazurin microtiter assay plate (REMA) for detection of resistant to PZA in *M. tuberculosis*. The research resulted the article: “Application of the resazurin microtiter assay plate (REMA) for detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*”, that shows how the REMA proposal may contribute to the rapid detection of PZA resistance, in a fast, sensitive and specific method.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Pyrazinamide, REMA.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Disponível em: http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jac/for_authors/

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I.....	11
1.1 Introdução.....	11
1.2 Justificativa	16
1.3 Objetivos	17
1.4 Referências	18
2 CAPÍTULO II	21
2.1 Aplicação do método em microplaca utilizando resazurina (REMA- Resazurin Microtiter Assay) para detecção de resistência em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
3 CAPÍTULO III.....	38
3.1 Conclusões.....	38
3.2 Perspectivas Futuras.....	38

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença crônica causada por bacilos pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e sua forma clínica é caracterizada principalmente pelo comprometimento dos pulmões podendo também atingir outros sítios anatômicos ou ocorrer de maneira disseminada.¹ O *M. tuberculosis* apresenta-se em forma de bacilos curvos ou retos de 0,2 a 0,7µm de largura e 1,0 a 3,0µm de comprimento. Possuem a propriedade de álcool-ácido resistência, ou seja, têm a capacidade de formar complexos coloridos com os compostos derivados do trifenilmetano (fucsina e auramina) que resistem à descoloração pelo etanol-ácido, devido ao alto conteúdo lipídico de sua parede celular que contém ácidos graxos de cadeia longa, denominados ácidos micólicos. A natureza hidrofóbica de sua superfície celular leva a alterações na permeabilidade dos nutrientes através da célula dificultando seu crescimento, o que a torna uma bactéria de crescimento lento, demorando mais de sete dias para produzir colônias visíveis em meios de cultura sólidos.²

Apesar de quase ter sido erradicada em países desenvolvidos, a TB continua sendo um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento.³ Lamentavelmente, há atualmente mais casos de tuberculose no mundo do que em qualquer outro momento da história.⁴ Essa doença acomete principalmente pessoas na faixa etária correspondente à plena capacidade produtiva, afetando os setores de mais baixa renda da população, vindo a acarretar enorme prejuízo econômico ao país.⁵

Os fatores que intensificaram o crescimento desta enfermidade foram o surgimento, na década de 80, da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a deterioração das condições sócio-econômicas com piora das condições sociais, a facilidade de movimentos migratórios, as deficiências das instituições de saúde e o aumento dos casos resistentes às drogas antituberculosas.⁶ A pandemia da AIDS modificou não apenas a tendência epidemiológica da tuberculose e infecções causadas por outras micobactérias, mas também a apresentação clínica da tuberculose, duração do tratamento, resistência às drogas antituberculosas, intolerância medicamentosa e possivelmente a susceptibilidade dos comunicantes.⁷

A TB é transmitida de pessoa a pessoa por via aérea, por meio de gotículas de 1,0µm a 5,0µm de diâmetro, produzidas pelo indivíduo portador da forma clínica pulmonar ou laríngea da doença, ao tossir, espirrar ou falar.⁸

Esta doença leva a óbito aproximadamente 2 milhões de pessoas a cada ano e é estimado que entre 2002 e 2020 aproximadamente 1 bilhão de indivíduos serão infectados, e destes, 150 milhões adoecerão resultando em 36 milhões de mortes, se o controle desta doença não for assumido urgentemente.⁹

O relatório de epidemiologia da tuberculose elaborado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) calcula que ocorreram 9,27 milhões de casos novos de tuberculose no mundo em 2007 (139/100.000 habitantes) dos quais 4,1 milhões apresentaram baciloscopia positiva e 1,37 milhões (14,8%) eram pacientes co-infectados com HIV. Neste relatório estima-se que 1,32 milhões de pessoas HIV negativos (19,7/100.000 habitantes) morreram por tuberculose em 2007, e houve um adicional de 456.000 mortes em pessoas HIV positivas.¹⁰

O Brasil ocupa o 14º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo.¹⁰ Estima-se que cerca de 50 milhões de brasileiros sejam portadores do bacilo com aproximadamente 90.000 casos novos da doença e cinco mil óbitos. O número de casos notificados não representa a plena realidade, pois parte considerável dos doentes não é registrada oficialmente.¹¹

O Programa de Controle da Tuberculose (PCT) no Brasil tem como principal meta a descoberta precoce de casos novos e tratamento dos casos infectantes para a interrupção da cadeia de transmissão da tuberculose. Neste contexto, o laboratório participa fornecendo suporte diagnóstico por técnicas laboratoriais que exercem importante influência na avaliação clínica e epidemiológica das ações desenvolvidas no combate desta doença.¹²

Desde o desenvolvimento das técnicas de coloração para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em 1882 por Robert Koch, os princípios do diagnóstico microscópico da tuberculose têm mudado muito pouco. O diagnóstico rotineiro da TB pulmonar, em nosso país, é realizado, de modo geral, pela pesquisa direta de bacilos em esfregaços de escarros (Baciloscopia), utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen.¹³

A baciloscopia apesar de ser uma técnica simples, rápida, específica e de baixo custo, apresenta baixa sensibilidade que varia de 22 a 49%. Para obtenção de um resultado positivo são necessários pelo menos 5×10^3 bacilos/mililitro de escarro.^{14,15} Além disso, essa técnica impossibilita o isolamento da micobactéria, a baciloscopia não permite desta forma, a identificação da espécie, nem a avaliação do perfil de resistência as drogas antituberculosas. Sendo ainda inadequada para pacientes paucibacilares e nos doentes de AIDS onde a cultura direcionada para BAAR é sempre recomendada. Enfim, a baciloscopia tem sido utilizada amplamente como método diagnóstico básico, contudo, observa-se, que embora propicie uma substancial contribuição, seu rendimento diagnóstico, em geral, situa-se em torno de 50%.¹⁶

Na detecção do *M. tuberculosis* a cultura em meio de Lowenstein-Jensen é considerada o padrão ouro no Brasil, sendo necessário entre 10 a 100 células bacterianas viáveis para obter um resultado positivo.^{4, 12} A sensibilidade desta pode variar de 20 a 90%, dependendo da quantidade de amostra submetida à cultura e da infra-estrutura do laboratório no tratamento prévio de descontaminação do material a ser cultivado. Sua principal desvantagem é o longo tempo necessário (4-8 semanas) para o crescimento de micobactérias em meio sólido. Além disso, os requisitos para a realização de cultura incluem uma infra-estrutura adequada, incluindo as medidas de biossegurança e boa capacidade técnica.¹⁷

A utilização de meio de cultura líquido (7H9 Middlebrook) é uma forma de diminuir o tempo necessário para o crescimento do bacilo. O Sistema BACTEC 460TB (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Baltimore, Maryland, EUA) é amplamente reconhecido como um método de referência para detecção das micobactérias, que combina as vantagens do meio de cultura líquido com semi-automação. No entanto, esse sistema utiliza radioisótopos para a detecção de crescimento. Já o BACTEC MGIT 960 usa a fluorescência como indicador do crescimento em tubo. Apesar de permitirem rápida detecção do crescimento micobacteriano são equipamentos bastante onerosos e, portanto, difíceis de serem amplamente utilizados em países em desenvolvimento.¹⁸

Os medicamentos que podem curar a maioria dos casos de TB estão disponíveis desde o final dos anos 40. A eficácia no tratamento pode alcançar até 97% quando aplicado corretamente o esquema terapêutico selecionado, assegurado a distribuição regular das drogas em sua correta associação e utilizada em doses certas e por tempo suficiente para garantir a cura do doente. Contudo, em 2007, essa doença ainda ocupou o segundo lugar como causa de morte por agente infeccioso no Brasil, com 1,77 milhões de mortes, perdendo apenas para a AIDS.¹⁷

O tratamento recomendado pela OMS para casos novos de TB consiste no uso por dois meses, de isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA), combinado com uma quarta droga (estreptomomicina ou etambutol); seguido de quatro meses usando INH e RMP.^{19,20} Como o tratamento é longo, e as drogas utilizadas possuem importantes efeitos colaterais, com frequência o tratamento é interrompido. Quando ocorre alguma falha no tratamento pode acontecer resistência secundária as drogas antituberculosas e a disseminação de bacilos resistentes que por sua vez, levam à resistência primária, ou seja, a presença de *M. tuberculosis* resistentes em doentes sem história de tratamento prévio.

Na literatura internacional, o conceito de multidroga resistência (TB-MDR) é definido como resistência à rifampicina e à isoniazida.²¹ No Brasil, optou-se por uma definição

operacional de TB-MDR e refere-se a qualquer forma clínica da doença na qual o exame bacteriológico detecta resistência *in vitro* à, pelo menos, RMP, INH e à mais um fármaco antituberculoso (PZA, estreptomicina, etambutol, pirazinamida e etionamida) preconizados pelo Programa de Controle da Tuberculose.^{22,23}

A TB-MDR está afetando todos os países e atingiu, em 2008, a maior prevalência já documentada mundialmente na Europa Oriental e Ásia Central, onde mais de 20% dos isolados clínicos de novos casos são resistentes a múltiplas drogas.²⁴

No Brasil, a resistência aos fármacos antituberculosos está relacionada principalmente ao uso irregular de medicamentos, alta taxa de abandono do tratamento por pacientes ainda com doença ativa e também por prescrições inadequadas.²² Em estudo mundial da resistência às drogas antituberculosas feito pela OMS, em 1997, o Brasil apresentava um índice de resistência primária de 8,6% a, pelo menos, uma droga e resistência secundária de 14,4%. O índice de cepas de *M. tuberculosis* multi-droga resistentes foi de 5,4% para pacientes que já haviam recebido tratamento anterior. Já entre os pacientes que não haviam recebido tratamento prévio foi bem menor, 0,9%.²⁰

Até o momento, foram identificadas algumas das características constitutivas que determinam a resistência intrínseca das micobactérias aos antibióticos de amplo espectro e das micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. A principal característica é a constituição da parede celular das micobactérias, de alto conteúdo lipídico, que dificulta a penetração dos antibióticos no interior do bacilo. Também, alguns receptores e enzimas micobacterianas impedem a ação de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. A resistência do *M. tuberculosis* e de algumas micobactérias de crescimento rápido aos beta-lactâmicos explica-se também pela presença de beta-lactamases constitutivas.²⁵

Quando há falha no tratamento com os fármacos de primeira escolha, ou seja, quando há resistência aos antimicobacterianos comuns, as drogas de segunda linha se tornam única opção (Amicacina, Capreomicina, Ciprofloxacino, Etionamida, Kanamicina, Ofloxacino). Porém, elas apresentam baixa eficácia, requerem um período maior de administração (18-24 meses), apresentam maior custo e vários efeitos adversos com baixa taxa de cura (aproximadamente 60%).²⁶

Rifampicina e isoniazida são os fármacos mais potentes utilizados no tratamento da TB, podendo eliminar mais de 99% dos bacilos nos dois primeiros meses de tratamento. Porém, a resistência a esses fármacos tem aumentado significativamente no mundo, devido à intervenção inadequada na mutação espontânea do *M. tuberculosis*. Normalmente a taxa de

mutação espontânea, que resulta na presença de uma pequena proporção de microrganismos resistentes a determinado fármaco independentemente de uma exposição prévia, pode variar de acordo com a concentração e o tipo do fármaco. Numa população selvagem de *M. tuberculosis* são encontrados mutantes resistentes para isoniazida e para rifampicina na ordem de 10^{-6} e 10^{-8} respectivamente. Esta proporção não é afetada pela presença do fármaco, pois estes não são mutagênicos, nem induzem o aparecimento de determinada resistência.²⁷ Embora essas mutações sejam eventos quantitativamente raros, quando ocorrem em numerosas populações de micobactérias e sobre pressão seletiva pelo uso de um único fármaco ou abandono do tratamento, podem favorecer ao predomínio de cepas resistentes sobre as sensíveis. Portanto a administração incorreta desses fármacos induz a seleção de população de bacilos resistentes.²⁵

A pirazinamida, um análogo estrutural da nicotinamida, que é um precursor da Vitamina B3 (ácido nicotínico, também chamado de niacina), teve sua atividade contra o bacilo da tuberculose comprovada em 1952, mas somente se tornou um componente importante da quimioterapia de curta duração em meados dos anos 80. Ela atua no microambiente ácido do macrófago (pH 5,5) encontrado na inflamação aguda e mata pelo menos 95% dos bacilos semidormentes durante as duas primeiras semanas de tratamento. Esta atuação desempenha um papel chave na terapia de curta duração, uma vez que nenhuma outra droga utilizada no tratamento da tuberculose é capaz de agir em ambiente ácido.²⁸ A atividade de esterilização da PZA permite que o tempo de tratamento seja reduzido de 9 a 12 para 6 meses.²⁹ Apesar de sua notável atividade *in vivo*, a PZA não é ativa contra *M. tuberculosis* nas condições de cultura normais onde o pH se encontra aproximadamente neutro. O pH do meio é o fator mais importante na determinação da atividade da PZA.³⁰

A PZA é um pró-fármaco que requer conversão a sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), pela enzima pirazinamidase (PZase), que é codificada pelo gene *pncA*.^{30,31} Embora o mecanismo de ação do POA permaneça desconhecido, tem sido sugerido que o acúmulo de POA em pH ácido, pode interromper o potencial de membrana do bacilo, afetando o transporte de nutrientes.³⁰

Muitos grupos de pesquisa têm identificado várias mutações nesse gene que podem levar a perda de atividade PZase, parecendo ser esse o principal mecanismo de resistência a essa droga.³²⁻³⁵ Em concordância a esses achados essa mutação também é encontrada em cepas de *M. bovis*, que são naturalmente resistentes à PZA.³⁶

As mutações associadas à resistência PZA *in vitro* incluem a substituição de nucleotídeos, inserções e deleções de um ou mais bases, e eliminação completa do gene *pncA*.

Além disso, alguns autores têm referido a detecção de cepas resistentes que mantiveram a atividade PZase,^{35,37,38} sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência a pirazinamida.

Os testes convencionais para detecção de resistência à PZA utilizados rotineiramente têm um valor limitado, uma vez que o pH baixo, utilizado para avaliar a atividade da droga, é inibidor do crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*.³⁶ A necessidade de meio ácido proporciona maior dificuldade na realização destes testes que não são rotineiramente empregados em muitos laboratórios.

JUSTIFICATIVA

O diagnóstico precoce e a realização do teste de susceptibilidade as drogas de qualquer doença infecciosa, inclusive da TB, é de extrema importância para evitar a evolução da doença e instituir tratamento precoce e efetivo com o objetivo de conter a transmissão da infecção para indivíduos saudáveis. Além disso, devido ao aparecimento de TBMDR e da extensivamente resistente (TBXMDR) aos medicamentos, existe uma enorme demanda por métodos novos, rápidos e precisos de detecção de susceptibilidade, em particular nos países em desenvolvimento.

O método das proporções em Lowenstein-Jensen (L-J), comumente usado para detecção de susceptibilidade, exige várias semanas para que se tenha um resultado confiável, tornando muitas vezes, os resultados clinicamente irrelevantes. Durante a preparação, o meio de cultura é submetido à temperatura de 80°C o que pode inativar a droga a ser testada acarretando um resultado falsamente resistente.

Os testes comercialmente disponíveis, tais como Sistema BACTEC 460 TB e 9000 e BACTEC MGIT 960 reduzem significativamente o tempo de detecção da susceptibilidade, mas requerem o uso de radioisótopos ou reagentes e equipamentos caros, tornando muitas vezes inviável sua implantação em alguns laboratórios.

Foram desenvolvidos testes utilizando meios de cultura líquidos como MTT (3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5-diphenyltetrazolium bromide), Alamar Blue (MABA), Resazurina (REMA) e Microdiluição em Caldo. Estes testes são rápidos e provaram ter boa sensibilidade e especificidade para a detecção de resistência a INH e RMP quando comparado com o método das proporções como padrão ouro.

Dentre esses testes o REMA é um método confiável e simples de ser executado. Este utiliza a oxi-redução da resazurina como indicador colorimétrico para a determinação da resistência às drogas e obtenção da concentração inibitória mínima (CIM). Além disso, o custo do teste varia de acordo com a configuração e onde é usado, no entanto, possui menor custo quando comparado com o método das proporções. Além disso, ao contrário dos métodos moleculares, não requer equipamento específico.

Entretanto, esses estudos não utilizaram a PZA para determinação da CIM, devido à dificuldade na utilização de meio de cultivo ácido. A acidez do meio exigido para atividade da droga pode inibir o crescimento da micobactéria. Dessa forma, se faz necessário a avaliação de métodos rápidos e de baixo custo para detecção de resistência à PZA em *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o uso do método em microplaca utilizando Resazurina como agente revelador (REMA) para detecção de resistência à pirazinamida (PZA) em *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos Específicos

Padronizar o teste de susceptibilidade a pirazinamida em microplacas utilizando resazurina como agente revelador (REMA).

Determinar os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para pirazinamida em isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes utilizando técnica REMA.

Avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica REMA em relação a outros testes de detecção de resistência à PZA.

REFERÊNCIAS

1. Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB *et.al.* Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007; **28**: 251-7.
2. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. Microbiologia ilustrada. Porto Alegre: *Artmed*, 2004; 259-72.
3. Liberato IRO, Albuquerque MFPM, Campelo ARL *et al.* Características da tuberculose pulmonar em pacientes com sorologia positiva e negativa para o HIV em uma região do Nordeste do Brasil. *Rev da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004; **37**: 46-50.
4. Zumla A, Mwaba P, Kapata N *et. al.* Reflections on the white plague. *Lancet Infect Dis.* 2009; **9**(3):197-202.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de referência professor Helio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 1994.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2005. http://www.who.int/tb/publications/global_report2005/sumary/en/index.html
7. Pinto WP, Tuberculose e resistência a drogas em pacientes atendidos em um centro de referência para síndrome da imunodeficiência adquirida em São Paulo-Brasil. Tese de doutorado. Curso de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
8. Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986; **134**: 1062-71.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2003. Disponível em <http://www.who.int/gtb/publications/globrep/pdf/country-profiles/bra.pdf>.
10. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: *WHO report 2009*.
11. Barco P, Cardoso RF. Tuberculose e Resistência a Drogas. *Laes & Haes* 2003; 130–44.
12. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BL. A. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Revista de Saúde Pública* 1999; **33**: 281-6.
13. Cardoso RF. Análise de mutações nos genes relacionados com resistência a isoniazida (INH) em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de origem brasileira.

Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003: 135.

14. Susemihl MAAM, Ferrazolli M, UEKI SYM *et al.* Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. *Revista Brasileira de Patologia Clínica* 1993; **29**: 51-4.

15. Coelho AGV, Zamarioli LA, Vicente MP *et al.* Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o isolamento de micobactérias. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 1999; **58**: 57-61.

16. Morrone N. Diagnóstico da tuberculose em sintomáticos respiratórios. Comentários a respeito da II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia e Ministério da Saúde. *J Bras Pneumol* 2005; **31**: 350-5.

17. Aziz M, Ryszewska K, Vincent V *et.al.* Expanding culture and drug susceptibility testing capacity in tuberculosis diagnostic services: the new challenge. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; **11**: 247-50.

18. Huang T, Lee SS, Tu H *et al.* Correlation between Pyrazinamide activity and pncA mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3672-3.

19. Fattorini L, Migliori GB, Cassone A. Extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: an old and new threat. *Ann Ist Super Sanità* 2007; **43**: 317-9.

20. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. *Global Project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance*. Geneva: WHO; 1997.

21. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis. Fact sheets. http://www.wpro.who.int/tb/media_centre/fact_sheets (acessado em 18/05/2007).

22. Fiúza De Melo FA, NETO IDE, SEICENTO J *et.al.* Tuberculose Multirresistente. *Jornal de Pneumologia* 1993; **18**; 73-82.

23. Castelo Filho A, Kritski AL, Barreto ÂW *et al.* II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J Bras Pneumol* 2004; 30 Sup1: p.S57-S86.

24. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: report no. 4 Geneva: World Health Organization; 2008: http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf

25. Barrera, L. Acerca de la resistencia de las micobacterias a los antibióticos, um enfoque microbiológico. *Infect. & Microbiol. Clin* 1994; **6**: 192-8.

26. Souza MVN Current status and future prospects for new therapies for pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2006; **12**: 1-4.

27. Palaci M, Ueki SYM, Curcio M *et.al.* Quimioterapia da tuberculose: fundamentos, regimes e resistência bacteriana. *Rev Ciênc Farm* 1997; **18**: 29-40.
28. Heifets L, Lindholm-Levy P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am Rev Respir Dis* 1992; **145**: 1223-5.
29. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infec Dis* 1998; **4**: 195-209.
30. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; **7(1)**: 6-21.
31. Konno K, Feldman FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis* 1967; **95**: 461-9.
32. Huang T, Lee SS, Tu H *et al.* Correlation between Pyrazinamide activity and *pncA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3672-3.
33. Morlock GP, Crawford JT, Butler R *et al.* Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2291-5.
34. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J *et al.* *pncA* mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2736-8.
35. Barco P, Cardoso RF, Hirata RDC *et al.* *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 930-5.
36. Jureen P, Wernfren J, Toro JC *et.al.* Pyrazinamide Resistance and *pncA* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents and Chemother* 2008; **52**: 1852-4.
37. Cheng S, Thibert L, Sanchez T *et al.* *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 528-32.
38. Lee KW, Lee J, Jung K. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Korean Med Sci* 2001; **16**: 537-43.

CAPÍTULO II

Artigo: “DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA A PIRAZINAMIDA EM *Mycobacterium tuberculosis* PELO MÉTODO EM MICROPLACA UTILIZANDO RESAZURINA (REMA - RESAZURIN MICROTITER ASSAY)”

**DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA A PIRAZINAMIDA EM
Mycobacterium tuberculosis PELO MÉTODO EM MICROPLACA
UTILIZANDO RESAZURINA (REMA - RESAZURIN MICROTITER
ASSAY)**

**RAPID DETECTION OF RESISTANCE TO PYRAZINAMIDE IN
Mycobacterium tuberculosis STRAINS BY RESAZURIN MICROPLATE
ASSAY (REMA)**

Paula Aline Zanetti Campanerut¹, Luciana Dias Ghiraldi², Fernanda Luiza Espinosa Sposito¹,
Daisy Nakamura Sato³, Clarice Queico Fujimura Leite⁴, Rosilene Fressatti Cardoso⁵.

¹Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ³Instituto Adolfo Lutz Ribeirão Preto, SP; ⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Araraquara, SP; ⁵Orientadora do trabalho, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o uso da técnica em microplaca utilizando Resazurina como agente revelador (REMA- Resazurin Microtiter Assay) para detecção rápida de resistência a pirazinamida (PZA) em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Materiais e métodos: Foram estudados 34 isolados clínicos previamente identificados como *M. tuberculosis*. O perfil de resistência dos isolados a PZA foi previamente determinado pelo método das proporções em Lowenstein-Jensen (L-J) e comparado com o método REMA, método de microdiluição em caldo (MC) e determinação da pirazinamidase (PZase).

Resultados: O método REMA forneceu resultados com apenas 8 dias e demonstrou 100% de especificidade e sensibilidade quando comparado com o método das proporções em L-J. O método MC apesar de também apresentar 100% de sensibilidade e especificidade demanda maior tempo para leitura dos resultados. A determinação da PZase apresentou menor sensibilidade 87,50% e 100% de especificidade.

Conclusão: O método REMA mostrou ser um teste reprodutível, rápido, de baixo custo e fácil de ser executado, que pode ser aplicado para detecção de resistência a PZA em *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, resistência, pirazinamida, REMA.

INTRODUÇÃO

A pirazinamida (PZA), um análogo estrutural da nicotinamida, atua no microambiente ácido do macrófago (pH 5,5) encontrado na inflamação aguda e mata pelo menos 95% dos bacilos semidormentes durante as duas primeiras semanas de tratamento da tuberculose (TB). Esta atuação desempenha um papel chave na terapia de curta duração e permite que o tempo de tratamento seja reduzido de 9 a 12 para 6 meses.^{1,2}

A PZA é um pró-fármaco que requer conversão à sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), pela enzima pirazinamidase (PZase), que é codificada pelo gene *pncA*.^{3,4} Embora o mecanismo de ação do POA permaneça desconhecido, há sugestões de que o acúmulo de POA em pH ácido, possa interromper o potencial de membrana do bacilo, afetando o transporte de nutrientes.³

Alguns estudos demonstram que várias mutações no gene *pncA* podem levar a perda de atividade da PZase, o que parece ser o principal mecanismo de resistência a esse fármaco em *Mycobacterium tuberculosis*.⁵⁻⁹ Em concordância a esses achados essa mutação também é encontrada em cepas de *Mycobacterium bovis*, que são naturalmente resistentes à PZA.^{10,11} No entanto, alguns autores detectaram *M. tuberculosis* resistentes que mantiveram a atividade PZase,^{8,12,13} sugerindo outros mecanismos envolvidos na resistência à PZA.

A tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) atingiu, em 2008, a maior prevalência já documentada mundialmente na Europa Oriental e Ásia Central, onde mais de 20% dos novos casos foram resistentes a múltiplas drogas.¹⁴ Dessa forma, o diagnóstico precoce e a realização do teste de detecção de resistência às drogas são de extrema importância para evitar a evolução da TB e instituir tratamento precoce e efetivo com o objetivo de conter a transmissão da infecção.

O método das proporções em Lowenstein-Jensen (L-J), comumente usado para determinação do perfil de resistência em *M. tuberculosis*, exige várias semanas para o crescimento micobacteriano, tornando muitas vezes, os resultados clinicamente irrelevantes.¹⁵ Além disso, a realização desse teste utilizando PZA é difícil, pois a droga é ativa apenas em pH ácido, ambiente que pode proporcionar inibição de cerca de 50% na contagem de colônias e uma redução considerável no tamanho da colônia em comparação com o pH neutro.¹⁶

Os testes comercialmente disponíveis, tais como Sistema BACTEC 460 TB e 9000 e BACTEC MGIT 960 reduzem significativamente o tempo de detecção da susceptibilidade, mas requerem o uso de radioisótopos ou reagentes e equipamentos caros, tornando muitas vezes inviável sua implantação em alguns laboratórios.¹⁷

No sentido de desenvolver métodos de detecção de resistência com menor tempo de leitura, testes utilizando meios de cultura líquidos vêm sendo propostos, como Alamar Blue (MABA- Microplate Alamar Blue Assay),¹⁸ Microdiluição em Caldo (MC),¹⁹ MTT (3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5-diphenyltetrazolium bromide)²⁰ e Resazurina (REMA-Resazurin Microtiter Assay Plate)²¹. Estes testes são rápidos e mostram boa sensibilidade e especificidade para a detecção de resistência a Isoniazida (INH) e Rifampicina (RMP) quando comparado com o método das proporções.²²

Dentre esses testes, o REMA que utiliza a oxi-redução da resazurina como indicador colorimétrico para a determinação da resistência às drogas e obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM), é um método simples de ser executado e confiável.^{21,23} Além disso, este teste apresenta menor custo quando comparado com o método das proporções²⁴ e, ao contrário dos métodos moleculares, não requer equipamento específico.²² Entretanto, estudos utilizando REMA avaliaram o perfil de resistência de isolados de *M. tuberculosis* apenas contra INH e RMP, devido a dificuldade na realização da técnica com a PZA. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi padronizar e avaliar o uso do método em microplaca utilizando resazurina como agente revelador (REMA) para detecção de resistência à PZA em isolados de *M. tuberculosis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras Bacterianas

Foram utilizadas cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv com sensibilidade à INH, RMP e PZA e *M. bovis* AN5 com resistência à PZA para padronização do método REMA e para controle de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelos métodos REMA, Microdiluição em Caldo (MC) e das proporções. Para a determinação da atividade da PZase foi utilizado cepa *Mycobacterium avium* ATCC 13950 como controle positivo de atividade da enzima.

Foram estudados 34 isolados clínicos previamente identificados como *Mycobacterium tuberculosis*, provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá (DAC/UEM). Dentre esses isolados, oito (8) se mostraram resistentes e vinte e seis (26) sensíveis à PZA pelo método das proporções em Lowenstein-Jensen (L-J) (Difco Laboratories, Detroit, USA).²⁵

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os valores da CIM foram determinados utilizando três métodos: método das proporções em meio sólido L-J²⁵, método em microplaca utilizando a Resazurina como agente revelador (REMA),²¹ e método de microdiluição em caldo (MC)¹⁹. As determinações da CIM de cada isolado foram realizadas em triplicata para cada método utilizado e definida como a menor concentração de PZA capaz de impedir o crescimento micobacteriano. O ponto de corte utilizado nas três metodologias, para considerar um isolado de *M. tuberculosis* sensível foi $CIM \leq 100\text{mg/L}$.

Método das Proporções em Lowenstein Jensen (L-J)

O método das proporções em L-J foi realizado como anteriormente descrito por Cannetti e Grosset²⁵ modificado. Dessa forma, o inóculo bacteriano foi preparado a partir da diluição 1:100 da suspensão micobacteriana previamente padronizada com a escala de McFarland nº 1. Em seguida 100µL da suspensão micobacteriana foi inoculada em meios de L-J com pH ajustado para pH 5,2 contendo diferentes concentrações de PZA (12,5 a 3200mg/L). Para cada isolado foram utilizados como controle de crescimento micobacteriano um tubo com meio de L-J pH 5,2 e outro com pH 6,8. Os tubos foram incubados por 28 dias a 37°C. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir mais de 99% do crescimento comparado com o controle em L-J pH 5,2.

Método em microplaca utilizando Resazurina como agente revelador (REMA)

A microplaca de 96 orifícios (Kartell, Milão, Itália) para método REMA foi preparada segundo Palomino *et.al.*²¹ Inicialmente foram distribuídos 200µl de água destilada estéril nos orifícios externos da microplaca, em seguida, utilizando 100µl do meio de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) pH 6,0 suplementado com OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA), foram realizadas diluições seriadas de PZA (Pirazinamida - Sigma St. Louis, MO, USA) com concentrações finais de 12,5 a 3200mg/L. Para cada isolado estudado foi utilizado um orifício contendo 100µl de inóculo micobacteriano e 100µl de meio de cultivo Middlebrook 7H9 pH 6,0 suplementado com OADC como controle de crescimento e outro orifício contendo apenas 200µl meio de cultivo Middlebrook 7H9 como controle de esterilidade.

As suspensões bacterianas foram preparadas adicionando uma alçada do crescimento em L-J em tubos contendo 2 mL de meio Middlebrook 7H9 e pérolas de vidro estéreis. O tubo foi agitado e deixado em repouso por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente

transferido para outro tubo e em seguida, foi realizada comparação visual da turvação com escala de McFarland nº 1. Uma vez padronizada a suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:20 em Middlebrook 7H9 pH 6,0 suplementado com OADC.

As microplacas foram inoculadas com 100µL de cada suspensão bacteriana preparada, seladas e incubadas a 37°C por 7 dias. Após esse período, foi adicionado 30µL da solução de Resazurina (Acros, New Jersey, USA) 0,01% recém preparada em cada orifício e novamente incubada a 37°C por 24 horas para 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 PZA capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano, ou visualmente, a menor concentração da PZA capaz de impedir a viragem da cor de azul para rósea.

Método de Microdiluição em Caldo (MC)

O preparo da microplaca para o método MC foi realizado como descrito por Leite *et.al.*¹⁹ A suspensão bacteriana foi padronizada com a escala a de McFarland nº 0,5 e então, diluída 1:100 em Middlebrook 7H9 pH 6,0 suplementado com OADC.

Cada orifício contendo as concentrações de PZA (3200mg/L a 12,5mg/L) foram inoculadas com 5µL da suspensão bacteriana diluída, seladas e incubadas a 37°C. A leitura foi realizada por observação visual de crescimento micobacteriano característico pela formação de um botão no fundo dos orifícios da microplaca com 14, 20 e 28 dias.

Determinação da Pirazinamidase (PZase)

A atividade da PZase foi avaliada pelo método desenvolvido por Wayne²⁸ e modificado por Morlock *et. al.*²⁹ Uma alçada do crescimento bacteriano de três semanas em L-J de cada isolado clínico de *M. tuberculosis* foi semeada em duplicada na superfície do meio Dubos broth (Difco Laboratories, Detroit, USA) e incubados a 37°C.

Um tubo inoculado com *M. avium* e um tubo contendo meio de cultivo Dubos broth com 100ug ácido pirazinóico (2-Pyrazinecarboxylic acid, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA) foram incluídos como controle positivo para PZase. E como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultivo Dubos broth sem ser inoculado.

Um primeiro tubo de cada isolado e dos controles foi revelado após 7 dias de incubação e o segundo após 14 dias. Para tal, 1 mL de solução de sulfato ferroso amoniacal 1% (Quimibrás Indústrias Químicas S. A., Rio de Janeiro) foi adicionado aos meios de cultura e

deixados à temperatura ambiente por uma hora. O isolado foi considerado positivo para atividade de PZase quando uma banda rosa difusa foi observada na superfície do meio.

Sequenciamento do gene *pncA*

O seqüenciamento de um segmento de 1200 pares de bases da fase aberta de leitura do gene *pncA* incluindo sua região regulatória foi realizado previamente por Barco *et.al.*⁸ em ABI Prism3100 DNA analyser (Applied Biosystems Ins., Foster City, CA, USA).

Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste qui-quadrado com intervalo de confiança de 95%. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes utilizando o software EpiInfo Versão 3.3.2.

RESULTADOS

As cepas padrões de *M. tuberculosis* H₃₇Rv e *M. bovis* AN5 mostraram resultados concordantes com o esperado, ou seja, a primeira apresentou sensibilidade à INH, RMP e PZA e a segunda, resistência à PZA pelas quatro metodologias empregadas.

Os resultados das CIM para PZA, atividade da PZase e características moleculares dos oito isolados de *M. tuberculosis* resistentes estudados estão mostrados na Tabela 1. Dois isolados de *M. tuberculosis* (1137 e 3224) não apresentaram crescimento pelo método MC sendo que o último apresentou atividade da enzima PZase e não apresentaram mutação no gene *pncA* e em sua região regulatória. Os resultados das CIM para PZA e atividade da PZase dos 26 isolados *M. tuberculosis* sensíveis estão mostrados na Tabela 2.

Entre os 34 isolados, oito (23,53%) se mostraram resistentes e 26 (76,47%) sensíveis a PZA, quando utilizado o método REMA e o das proporções em L-J. Quando utilizado o método MC, 2 isolados considerados resistentes pelos métodos acima não apresentaram crescimento, sendo os restantes, 6 isolados (17,64%) resistentes e 26 (76,47%) sensíveis a PZA. Entretanto, quando utilizado o método de determinação da atividade da PZase o resultado encontrado foi de 7 (20,59%) isolados com ausência da atividade da enzima, sendo supostamente resistentes e 27 (79,41%) isolados com atividade da enzima, sendo supostamente sensíveis.

O tempo necessário para detecção indireta de resistência a PZA foi de oito dias quando utilizado o método REMA, 20 dias pelo método MC, 28 dias pelo método das proporções em L-J e sete dias pelo método de determinação da PZase.

Utilizando o método das proporções como padrão ouro, o desempenho dos outros três métodos de detecção de resistência à PZA foi determinado (Tabela 3). A sensibilidade e especificidade do método REMA e do método MC foram de 100% e para o método de determinação da PZase 87,50% e 100% respectivamente.

Quando utilizado o Teste Qui-Quadrado, comparando os métodos em estudo com o das proporções, obteve-se valor de $p= 1$ para o método REMA e MC, e $p= 0,999$ para o método de determinação da PZase, determinando, dessa forma, que não há diferença significativa entre os métodos rápidos de detecção da CIM para PZA e o método das proporções.

DISCUSSÃO

A detecção precoce da resistência aos fármacos é muito importante para o controle da tuberculose e para o início do tratamento adequado.²¹ Atrasos na detecção de resistência aos fármacos provaram ser fatal em pacientes com TB-MDR e em indivíduos co-infectados com vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), por isso o teste de susceptibilidade as drogas é um componente essencial do tratamento diretamente observado (DOTS).²⁹ No entanto, o método das proporções em L-J, rotineiramente utilizado no Brasil para detecção de resistência aos fármacos antituberculosos é trabalhoso, demanda tempo para obtenção dos resultados, além de possuir baixa reprodutibilidade em pH ácido, necessário para realização do teste de sensibilidade contendo PZA.¹⁶

Quando se estuda um novo método de diagnóstico ou de detecção de resistência, o desempenho do método utilizado em comparação com o padrão ouro é um parâmetro crucial. No entanto, o método das proporções em L-J, adotado como padrão ouro no Brasil, parece ser um método subjetivo para detecção de resistência a PZA devido à dificuldade na realização da técnica com a PZA e devido a dificuldade de crescimento da micobactéria em pH ácido, o que evidencia a necessidade da padronização de um método de detecção de resistência a PZA mais confiável e de fácil execução.

Assim como já relatado em estudos prévios com INH e RMP^{21,30,31} os resultados obtidos, no presente estudo, utilizando o método REMA para detecção de resistência à PZA foram concordantes quando comparados com o método das proporções em L-J, com 100% de sensibilidade e especificidade. Nateche *et.al*²³ quando realizaram essa comparação para

detecção de resistência a INH e RIF obtiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 98,3 e 99,2 % respectivamente, já Rivoire *et.al.*²² obtiveram 89% de sensibilidade e 100% de especificidade quando utilizaram REMA para detecção de resistência à RMP.

Além de demonstrar alta especificidade e sensibilidade deve ainda ser ressaltado que, os resultados obtidos pelo método REMA foram concluídos em apenas oito dias. Dessa forma, os dados a respeito da resistência à PZA, que é um fármaco de primeira escolha para o tratamento da TB, estarão disponíveis muito mais cedo em comparação com o método rotineiramente utilizado. Esta detecção de resistência à PZA de forma mais rápida contribuirá para o início do tratamento imediato e menor disseminação da TB resistente.

Outra vantagem da utilização do método REMA para detecção de resistência a PZA é sua facilidade de leitura. Taneja e Tyagi³² compararam os resultados obtidos na metodologia REMA para detecção de resistência a INH, RMP, etambutol (EMB), entre outros, por leitura visual e fluorimétrica e encontraram total concordância entre as duas formas de leitura. Isto confirma essa vantagem do método REMA, já que não se faz necessário o uso de nenhum equipamento sofisticado, o que diminui, dessa forma, o custo do ensaio e o risco de formação de aerossóis durante a manipulação das microplacas para leitura em fluorímetro.

Considerando o ponto de corte para PZA adotado em trabalhos anteriores^{6,8} como 100mg/L observou-se em nosso estudo que o método REMA permitiu uma fácil discriminação de resistência para todos os isolados de *M. tuberculosis* estudados. No entanto, o presente estudo foi realizado somente com oito isolados resistentes à PZA e todos apresentaram CIM maior ou igual a 800mg/L pelo método das proporções e MC. Dessa forma, ressaltamos a necessidade de estudos adicionais com isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA com valores de CIM menores para melhor avaliação da utilidade do método REMA para detecção de baixa resistência à PZA em isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

O método REMA é semelhante ao método MABA¹⁸ que utiliza o Alamar Blue como agente revelador. Ambos os métodos apresentam fácil interpretação dos resultados e excelente correlação com o método das proporções²¹. Estudos prévios⁸ avaliaram o MABA como um candidato para a determinação rápida de resistência à PZA em *M. tuberculosis*. Porém, a resazurina possui menor custo, o que possibilita seu fácil acesso em laboratórios de países em desenvolvimento.

Uma preocupação necessária na realização do método REMA é a adequada manipulação segundo normas de biossegurança e adequada utilização de controles de esterilidade a fim de minimizar possíveis contaminações comuns quando se utiliza microplacas e meio de cultura líquido.^{21,22}

No estudo realizado por Jadaum *et.al.*³³ para determinação da CIM para EMB pelo método REMA, em isolados de *M. avium* foram observadas diferenças significativas nos valores da CIM quando utilizado meio de cultivo sólido e líquido. Essa diferença é atribuída aos níveis de absorção e degradação do fármaco em meio sólido, durante o processo de coagulação do meio de cultivo bem como durante seu tempo de incubação, e o maior contato da droga com o crescimento bacteriano em meio de cultivo líquido. Porém, essa diferença só foi observada em nosso estudo, quando da comparação do método MC com o das proporções em alguns isolados estudados.

Assim como avaliado por Leite *et.al.*¹⁹, o método MC em nosso estudo mostrou bons resultados quanto à sensibilidade e especificidade para detecção de resistência à PZA. Os valores das CIM para PZA foram menores na maioria dos isolados de *M. tuberculosis* estudados, quando comparados com o método das proporções em meio sólido L-J, o que pode ser justificado pela dificuldade de leitura do MC, inoculo menor e também pelo maior contato da micobactéria com o fármaco como argüido por Jardaum *et.al.*³³ em determinação da resistência a etambutol em *M. avium*, utilizando o método REMA. Outra desvantagem observada em nosso estudo, quando da utilização do método MC para determinação de sensibilidade à PZA foi o tempo necessário de incubação para realização da leitura, que em média foi de 20 dias.

A relação entre a falta de atividade da PZase com a resistência a PZA já é bem conhecida, o que sugere o uso do método de determinação da atividade da enzima como teste de susceptibilidade à PZA.³⁴ Como esperado, a cepa padrão H37Rv e os isolados clínicos de *M. tuberculosis*, caracterizados como sensíveis à PZA pelo método das proporções, apresentaram resultado positivo para atividade da enzima PZase, ou seja, eles possuem a capacidade de hidrolisar a PZA produzindo o seu metabólito ativo, o Ácido Pirazinóico. A maioria dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* caracterizados como resistentes (87,5%) apresentaram, também como esperado, resultado negativo para atividade da PZase. A exceção ocorreu em apenas um isolado, que apesar do fenótipo de resistência à PZA pelos métodos REMA e das proporções em L-J, apresentou resultado positivo para atividade da enzima PZase. Este isolado não apresentou nenhuma mutação na sua região codificadora, bem como em sua região regulatória,⁸ o que justifica a presença de atividade da enzima. Vale ressaltar ainda, que outras mutações, que não mutações no gene *pncA*, já são levados em consideração pois, como encontrado em nosso estudo, este isolado resistente apresentou atividade da PZase e de acordo com alguns estudos^{8,9,11,35} isto provavelmente ocorra devido a alterações na captação de PZA pelo aumento do efluxo do fármaco ativo.

A grande utilidade do ensaio para detecção da PZase reside na rapidez, facilidade e alta especificidade, como observado no presente estudo (100%), e em outros relatos.^{34,36} A sensibilidade encontrada de 87,50%, é semelhante a anteriormente relatadas 82,85%, 83% e 79% por Singh *et.al.*,³⁴ Krishnamurthy *et.al.*³⁶ e Davies *et.al.*³⁷, respectivamente.

No presente estudo, a maioria dos isolados resistentes à PZA (87,5%) apresentaram mutações em seu gene *pncA* o que determina a perda de atividade da PZase, corretamente observado no teste de determinação da atividade da PZase. A análise do seqüenciamento do gene *pncA* fornece informações rápidas e úteis sobre a resistência à PZA, como observado em alguns estudos⁵⁻⁹ em que a maioria dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes apresentaram mutações nesse gene. No entanto, os equipamentos e reagentes utilizados nessa metodologia são de alto custo e nem sempre de fácil acesso, o que dificulta a realização rotineira dessa técnica em países em desenvolvimento onde os índices de TB são maiores.

Embora a pequena quantidade de isolados resistentes avaliados neste estudo, o método REMA demonstrou ser um teste reprodutível, rápido, de baixo custo, fácil de ser executado, não necessita de equipamentos especiais e pode ser aplicado para detecção rápida de resistência a PZA em *M. tuberculosis* principalmente em países com elevada prevalência de TB e instalações laboratoriais limitadas.

REFERÊNCIAS

1. Heifets L, Lindholm-Levy P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am Rev Respir Dis* 1992; **145**: 1223-5.
2. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infec Dis* 1998; **4**: 195-209.
3. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; **7(1)**: 6-21.
4. Konno K, Feldman FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis* 1967; **95**: 461-9.
5. Huang T, Lee SS, Tu H *et al.* Correlation between Pyrazinamide activity and *pncA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3672-3.
6. Morlock GP, Crawford JT, Butler R *et al.* Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2291-5.

7. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J *et al.* *pncA* mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2736–8.
8. Barco P, Cardoso RF, Hirata RDC *et al.* *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 930–5.
9. Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P. *Mycobacterium tuberculosis* genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. *Microbial Drug Resistance* 2009; **15**: 251-6.
10. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Med* 1996; **2**: 662–7.
11. Jureen P, Wernfren J, Toro JC *et.al.* Pyrazinamide Resistance and *pncA* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents and Chemother* 2008; **52**: 1852–4.
12. Cheng S, Thibert L, Sanchez T *et al.* *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 528–32.
13. Lee KW, Lee J, Jung K. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Korean Med Sci* 2001; **16**: 537–43.
14. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: report no. 4 Geneva: World Health Organization; 2008. http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf Acessado em jun 2008.
15. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a Guide for the Level III Laboratory. Washington DC: US Department of Health and Human Services, 1985.
16. Stottmeier KD, Beam RE, Kubica GP. Determination of drug susceptibility of *Mycobacterium* to pyrazinamide in 7H10 agar. *Am Rev Respir Dis* 1967; **95**: 1072–5.
17. Huang TS, Chen CS, Lee SSJ *et al.* Comparison of the BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB Systems for Detection of Mycobacteria in Clinical Specimens. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2001; **31**: 279-283.
18. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, *et al.* Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(2): 362-6.
19. Leite CQF, Beretta ALRZ, Anno IS *et.al.* Standardization of Broth Microdilution Method for *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; **95**: 127-9.

20. Foongladda S, Roengsanthia D, Arjattanakool W *et al.* Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; **6**: 1118–22.
21. Palomino JC, Martin A, Camacho M *et al.* Resazurin microtitre assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2720–2.
22. Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonalona T *et al.* Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; **11**(6): 683–8.
23. Nateche F, Martin A, Baraka S *et al.* Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *J Med Microbiol* 2006; **55**: 857–60.
24. Gabrielson J, Hart M, Jarelo A *et al.* Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J Microbiol Methods* 2002; **50**: 63–73.
25. Canetti G, Froman S, Grosset J *et al.* Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ* 1963; **29**: 565-78.
26. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL *et al.* High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**: 1901–6.
27. Molhuizen HOF, Bunschoten AE, Schouls LM *et al.* Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. In: Parish T, Stocker NG, eds. *Methods in Molecular Biology, Mycobacteria Protocols*. Totowa: Humana Press, 1998; **102**: 381–94.
28. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1974; **109**: 147–51.
29. Iseman, M. D. MDR-TB and the developing world a problem no longer to be ignored: the WHO announces ‘DOTS Plus’ strategy. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; **2**: 867.
30. Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J of Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 796–800.
31. Montoro E, Lemus D, Echemendia M *et al.* Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility

testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J of Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 500-5.

32. Taneja N K, Tyagi J S. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *J of Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 288–93.

33. Jadaun GPS, Agarwal C, Sharma H *et.al*. Determination of ethambutol MICs for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* isolates by resazurin microtitre assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; **60**: 152–5.

34. Singh P, Wesley C, Jadaun GPS *et.al*. Comparative evaluation of Lowenstein-Jensen proportion method BacT/ALERT 3D, System, and Enzymatic pirazinamidase assay for pyrazinamide susceptibility testing of for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 76-80.

35. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP *et al*. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3373–81.

36. Krishnamurthy A, Almeida D, Rodrigues C *et.al*. Comparison of pyrazinamide drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric BACTEC and enzymatic pyrazinamidase assay. *Indian J Med Microbiol* 2004; **22**: 166–8.

37. Davies AP, Billington OJ, McHugh TD *et.al*. Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3686–8.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima para pirazinamida, atividade da PZase, perfil genotípico e mutações no gene *pncA* de isolados resistentes de *M. tuberculosis* e cepas controles *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5

Isolado	CIM PZA (mg/L)			PZase	Mutações em <i>pncA</i>	
	REMA	MC	L-J		N	AA
H37Rv	100	12,5	100	+	SM	SM
AN5	>3200	>3200	>3200	-	G169C	H57N
3614	>3200	1600	1600	-	T464G	V155e
69A	>3200	>3200	>3200	-	A287C	K96T
15109	>3200	800	1600	-	T490	S164P
1137	>3200	n/c	800	-	T359G	L120R
73A	>3200	800	1600	-	T175C	S59P
3224	>3200	n/c	800	+	SM	SM
71A	>3200	800	1600	-	A11G	NA
5505	>3200	>3200	>3200	-	Deleção Total	

Onde: N-mudanças de nucleotídeo no gene *pncA*, AA-mudanças de aminoácidos na proteína Pirazinamidase, n/c-sem crescimento, *-não foi realizado, SM- sem mutação, NA-nenhuma alteração.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima para pirazinamida e atividade da PZase de isolados sensíveis de *M. tuberculosis* e cepas controles *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5

Isolado	CIM PZA (mg/L)			PZase
	REMA	MC	L-J	
H37Rv	100	12,5	100	+
AN5	>3200	>3200	>3200	-
36	100	25	100	+
742	≤12,5	≤12,5	100	+
1264	100	100	100	+
1118	100	100	12,5	+
23657	100	25	100	+
1s	100	≤12,5	100	+
3s	100	≤12,5	100	+
4s	50	50	100	+
5s	100	≤12,5	100	+
7s	100	≤12,5	100	+
9s	≤12,5	≤12,5	25	+
10s	100	≤12,5	100	+
13s	100	≤12,5	100	+
14s	≤12,5	≤12,5	100	+
16s	100	≤12,5	100	+
TB 19	100	≤12,5	100	+
TB 27	100	≤12,5	100	+
TB 40	100	50	50	+
TB 43	≤12,5	≤12,5	100	+
TB 46	100	25	100	+
TB 49	≤12,5	≤12,5	100	+
TB 54	≤12,5	≤12,5	100	+
TB 57	100	≤12,5	100	+
TB 71	100	≤12,5	100	+
TB 80	100	≤12,5	100	+
Mgá01	100	≤12,5	100	+

Tabela 3. Desempenho dos métodos REMA, MC e PZase

	% (n) *		
	REMA	MC	PZase
Sensibilidade	100 (34/34)	100 (32/32)	87,50 (33/34)
Especificidade	100 (34/34)	100 (32/32)	100 (33/33)
Valor Preditivo Positivo (VPP)	100 (8/8)	100 (6/6)	100 (8/8)
Valor Preditivo Negativo (VPN)	100 (26/26)	100 (26/26)	96,29 (27/26)
Valor de p	1	1	0,9999

Onde: * Valores em parênteses são os números de isolados; o primeiro representa o número de isolados detectados em cada parâmetro e o segundo representa o total de isolados de *M. tuberculosis* estudados.

Obs: os isolados que não apresentaram crescimento pelo método MC não foram consideradas para os cálculos estatísticos.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Embora a pequena quantidade de isolados resistentes avaliados, este estudo demonstrou que o método REMA parece ser um teste reprodutível, rápido, de baixo custo, fácil de ser executado, não necessita de equipamentos especiais e pode ser aplicada para detecção de resistência à PZA em *M. tuberculosis* principalmente em países com elevada prevalência de TB e instalações laboratoriais limitadas.

A rápida e fácil detecção de resistência a PZA contribuirá para o início do tratamento imediato e menor disseminação da TB resistente.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante da atual situação da TB no mundo fica evidente a necessidade do diagnóstico precoce e da realização do teste de susceptibilidade aos fármacos utilizados em seu tratamento a fim de evitar a evolução da doença e instituir tratamento precoce e efetivo com o objetivo de conter a transmissão da infecção.

Além disso, devido ao aparecimento de TB resistente aos medicamentos, existe uma enorme demanda por métodos novos, rápidos e precisos de detecção de resistência, em particular nos países em desenvolvimento.

Para confirmação do método em microplaca utilizando resazurina proposto como método de rápida detecção de resistência à PZA em *M. tuberculosis*, estudos adicionais com maior número de isolados clínicos resistentes à PZA serão conduzidos futuramente.