

Avaliação do teste de nitrato redutase para a detecção rápida de resistência aos medicamentos de primeira linha em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes em um hospital geral*

Evaluation of the nitrate reductase assay for the rapid detection of resistance to first-line medications in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a general hospital

Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur, Wânia da Silva Carvalho,
Raquel Bandeira da Silva, Rodrigo Gonçalves Cata Preta,
Lucas Almeida Fernandes Junior, Silvana Spíndola de Miranda

Resumo

Comparamos o teste de nitrato redutase com o método de proporções, considerado como padrão ouro, em 57 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte (MG). A sensibilidade, a especificidade e a acurácia para rifampicina e isoniazida foram de 100% para todas, enquanto essas foram, respectivamente, de 88,9%, 66,7% e 96,5% para estreptomicina e de 98,0%, 100% e 98,2% para etambutol. A média de tempo para a obtenção dos resultados foi de dez dias. Na amostra estudada, o teste de nitrato redutase mostrou grande acurácia e excelente concordância com o padrão ouro.

Descritores: *Mycobacterium tuberculosis*; Testes de sensibilidade microbiana; Tuberculose resistente a múltiplos medicamentos; Nitrato redutase.

Abstract

We compared the nitrate reductase assay with the proportion method, which is considered the gold standard, in 57 *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients treated at the Federal University of Minas Gerais Hospital das Clínicas, located in the city of Belo Horizonte, Brazil. For rifampin and isoniazid, the sensitivity, specificity, and accuracy of the nitrate reductase assay were all 100%, whereas they were 100%, 88.9%, and 66.7%, respectively, for streptomycin and 98.0%, 100%, and 98.2%, respectively, for ethambutol. The mean time to results was ten days. In the study sample, the nitrate reductase assay proved highly accurate and showed excellent concordance with the gold standard.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Microbial sensitivity tests; Tuberculosis, multidrug-resistant; Nitrate reductase.

A tuberculose permanece como uma das maiores causas de mortalidade e morbidade por infecção em humanos. A Organização Mundial de Saúde estima que um terço da população mundial esteja infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, com 9,4 milhões de novos casos e 1,3 milhão de mortes por tuberculose no mundo. A incidência mundial é de 140 casos por 100 mil habitantes.⁽¹⁾

O surgimento da tuberculose *multidrug resistant* (MDR, multirresistente), definida como aquela causada por cepas resistentes às duas drogas de primeira linha (isoniazida e rifampicina), assim como da forma *extensively drug resistant* (XDR, extensivamente resistente), definida como aquela causada por cepas resistentes àquelas duas drogas, a pelo menos uma fluoroquinolona e a pelo menos

* Trabalho realizado na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

Endereço para correspondência: Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur, Avenida Alfredo Balena, 190, Laboratório de Micobactérias, Faculdade de Medicina da UFMG, 2º andar, CEP: 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Tel. 55 31 3409-9599. E-mail: ffafileardi@gmail.com

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Recebido para publicação em 28/7/2011. Aprovado, após revisão, em 30/1/2012.

uma das três drogas injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina e capreomicina), tornaram esse cenário preocupante.⁽¹⁾ De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2008, houve aproximadamente 440.000 casos de tuberculose MDR, representando 3,6% de todos os casos de tuberculose no mundo.⁽¹⁾ No Brasil, o número de casos novos de tuberculose MDR, em 2002 e 2009, foi de 350 e 394, respectivamente.⁽²⁾ Na última década, várias propostas de técnicas rápidas para testes de sensibilidade aos medicamentos de primeira linha foram descritas, sejam métodos moleculares, sejam métodos automatizados, como BACTEC *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT) 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) e ESP II (TREK Diagnostics Systems Inc., Westlake, OH, EUA). Entretanto, tais métodos são caros, especialmente em países com recursos escassos. Métodos fenotípicos rápidos, como os colorimétricos, que são de fácil execução e têm baixo custo, representam alternativas àqueles métodos, como o método de nitrato redutase.⁽³⁻⁷⁾

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho do método de nitrato redutase na avaliação de cepas de *M. tuberculosis* frente aos fármacos de primeira linha. Foram isoladas 43 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Foram incluídas cepas isoladas entre janeiro de 2009 e junho de 2010 no Laboratório de Micobactérias do HC-UFMG. Todas as cepas foram identificadas como *M. tuberculosis*, e os testes de sensibilidade foram realizados no Centro de Referência do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias. Foram utilizadas 14 cepas de *M. tuberculosis* cedidas pela Fundação Ezequiel Dias que fazem parte de um painel internacional de proficiência de testes de sensibilidade. Os perfis de sensibilidade dessas cepas foram os seguintes: 1 cepa XDR (nº 1008), 4 cepas MDR (nº 192, 193, 213 e 230), 3 cepas resistentes a isoniazida e estreptomicina (nº 1578, 1669 e 1670), 3 cepas resistentes a rifampicina e estreptomicina (nº 445, 1695 e 1643), 1 cepa resistente somente a rifampicina (nº 639), 1 cepa resistente somente a isoniazida (nº 551) e 1 cepa resistente somente a estreptomicina (nº 202). A cepa de referência H37Rv (ATCC 27294) foi utilizada como controle sensível.

O método das proporções foi realizado segundo o estudo de Canetti et al.⁽⁸⁾ Os fármacos utilizados

para o teste de sensibilidade pela técnica de nitrato redutase foram rifampicina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA), *isonicotinic acid hydrazide* (Sigma Chemical), *ethambutol dihydrochloride* (Sigma Chemical) e sulfato de estreptomicina (Sigma Chemical).

A técnica de nitrato redutase foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Angeby e o manual de procedimentos da Unidade de Micobacteriologia do Instituto de Medicina Tropical, em Antuérpia, Bélgica.⁽⁹⁾

Foram preparadas soluções estoque de 10.000 µg/mL em água para os fármacos isoniazida, etambutol e estreptomicina, e duas diluições subsequentes foram preparadas para atingir a concentração crítica dos fármacos no meio. Foi utilizada somente uma solução estoque de 4.000 µg/mL diluída em etilenoglicol para rifampicina, e, a partir dessa, utilizou-se um volume adequado para atingir a concentração crítica no meio. As concentrações críticas no meio Löwenstein-Jensen (LJ) para isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol foram, respectivamente, 0,2 µg/mL, 40,0 µg/mL, 4,0 µg/mL e 2,0 µg/mL.

O meio de cultura LJ foi preparado de acordo com as especificações do fabricante (DIFCO™; Becton Dickinson) e acrescido de solução de nitrato de potássio para atingir a concentração final de 1,0 mg/mL. Foi preparado um lote do meio como descrito acima para ser utilizado como controle e outro acrescido dos fármacos isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol.

O teste foi realizado de acordo com os seguintes procedimentos: para cada meio LJ com o fármaco, foram adicionados 200 µL da suspensão bacteriana correspondente a 1 na escala de McFarland, e 200 µL da suspensão diluída 1:10 foi adicionada em três tubos de meio LJ sem o fármaco, utilizados como controles de crescimento. Após 7 dias de incubação a 37 °C, adicionou-se 500 µL da solução reveladora: 50% (v/v) de ácido clorídrico concentrado, 0,2% (p/v) de sulfanilamida e 0,1% (p/v) de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina em um dos tubos controle (sem o fármaco). Quando houvesse mudança de cor, de incolor para rosa, adicionava-se a solução reveladora nos tubos correspondentes com o fármaco. O tubo controle era descartado caso não ocorresse mudança de cor, e os outros eram reincubados. O procedimento foi repetido após 10 dias com o segundo tubo controle e,

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos quanto à sensibilidade aos fármacos testados em 57 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* através dos métodos das proporções e do método de nitrato redutase e resultados da sensibilidade e especificidade na comparação dos dois métodos.

Drogas	Método das proporções		Método de nitrato redutase		Sensibilidade	Especificidade
	Sensibilidade das cepas	Cepas	Cepas resistentes	Cepas sensíveis		
		n	n	n	%	%
Rifampicina	Resistente	11	11	0	100	100
	Sensível	46	0	46		
Isoniazida	Resistente	12	12	0	100	100
	Sensível	45	0	45		
Estreptomicina*	Resistente	9	8	1	88,9 ^a	98,0 ^b
	Sensível	48	1	47		
Etambutol**	Resistente	1	2	0	66,7 ^c	100
	Sensível	56	1	54		

^aIC95%: 0,68-1,09. ^bIC95%: 0,94-1,02. ^cIC95%: 0,13-1,20. *Kappa = 0,87. **Kappa = 0,79.

se necessário, após 14 dias com o terceiro tubo controle.

A cepa era considerada resistente quando a cor do tubo com o fármaco ficasse mais intensa que a do tubo controle e era considerada sensível quando não houvesse mudança de cor nos tubos com os fármacos ou a cor desses ficasse mais clara que a do tubo controle. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados das 57 cepas de *M. tuberculosis* testadas. Houve 100% de concordância entre o método das proporções e o método de nitrato redutase para rifampicina e isoniazida. Foram encontradas discordâncias para estreptomicina e etambutol. O tempo médio dos resultados foi de 10 dias.

A necessidade da introdução de testes rápidos para a detecção de resistência e para vigilância epidemiológica em tuberculose é significativa principalmente no contexto de um hospital-escola e de alta complexidade, no qual são realizados procedimentos complexos, como transplante de órgãos sólidos e de medula óssea, atendimento de pacientes com hepatopatias, nefropatias, diabetes mellitus e outras comorbidades, assim como pacientes imunocomprometidos, principalmente portadores de HIV, condições essas que favorecem o aparecimento de tuberculose MDR.

No presente estudo, os resultados encontrados foram semelhantes aos relatados em outros trabalhos,^(4,10-12) o que demonstra o excelente desempenho do método de nitrato redutase como um teste de sensibilidade. Essa metodologia apresentou excelente concordância, acurácia e

rapidez para a obtenção de resultados e, portanto, representa uma alternativa para o diagnóstico de tuberculose em laboratórios de países com escassez de recursos.

Referências

1. World Health Organization. Multidrug and Extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB) 2010 Global Report on Surveillance and Response. Geneva: World Health Organization; 2010.
2. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
3. Winn Jr W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, editors. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 1057-118.
4. Angeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):553-5. PMID:11825971. PMCID:153407. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.2.553-555.2002>
5. Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miörner H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1214-9. PMID:9574679. PMCID:104802.
6. 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*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2720-2. PMID:12121966. PMCID:127336. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>
7. Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2324-7. PMID:7494021. PMCID:228403.
8. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of

- testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ. 1969;41(1):21-43. PMID:5309084. PMCID:2427409.
9. Martin A, Palomino JC. Procedure Manual - Nitrate Reductase Assay (NRA) - Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. Antwerp: Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit; 2009.
10. Sanchoetene KO, von Groll A, Ramos D, Scholante AB, Hosscha G, Valença M, et al. Comparative evaluation of the nitrate reductase assay and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, against first line anti- tuberculosis drugs. Braz J Microbiol. 2008;39(1):16-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100004>
11. Martin A, Montoro E, Lemus D, Simboli N, Morcillo N, Velasco M, et al. Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods. 2005;63(2):145-50. PMID:15893391. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.004>
12. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2008;62(1):56-64. PMID:18407918. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn139>

Sobre os autores

Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur

Técnica de Nivel Superior. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

Wânia da Silva Carvalho

Professora Adjunta IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

Raquel Bandeira da Silva

Graduanda de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

Rodrigo Gonçalves Cata Preta

Graduando de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

Lucas Almeida Fernandes Junior

Graduando de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

Silvana Spíndola de Miranda

Professora Associada III. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.