



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE  
REDUÇÃO DE NITRATO VISANDO A DETECÇÃO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* MULTIRRESISTENTE**

**EVELEISE SAMIRA DE JESUS MARTINS**

**MANAUS  
ABRIL, 2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**EVELEISE SAMIRA DE JESUS MARTINS**

**AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE  
REDUÇÃO DE NITRATO VISANDO A DETECÇÃO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* MULTIRRESISTENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia” e na linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e ou Laboratorial”.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Júlia Ignez Salem**

**Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Aya Sadahiro**

**MANAUS  
ABRIL, 2010**

Martins, Eveleise Samira de Jesus

M386a Avaliação de modificações no método de redução de nitrato visando a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente / Eveleise Samira de Jesus Martins. - Manaus: UFAM, 2010.  
65 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Júlia Ignez Salem

Co-orientador: Aya Sadahiro

1. Tuberculose 2. Doenças infecto-contagiosas 3. Tuberculose – Diagnóstico I. Salem, Júlia Ignez II. Sadahiro, Aya III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616.24-002.5:614(043.2)

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

**EVELEISE SAMIRA DE JESUS MARTINS**

**AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE  
REDUÇÃO DE NITRATO VISANDO A DETECÇÃO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* MULTIRRESISTENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia” e na linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e ou Laboratorial”.

Aprovada em \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Júlia Ignez Salem, Presidente  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Felipe Gomes Naveca, Membro Interno  
Fundação Oswaldo Cruz/UFAM

Patrícia Puccinelle Orlandi Nogueira, Membro Externo  
Fundação Oswaldo Cruz

## *Dedicatória*

*A minha querida mãe, Socorro Martins, que  
me deu seu amor e que me incentivou a  
estudar.*

*A meu esposo André Luiz, pelo amor,  
compreensão e paciência em todos os  
momentos.*

## ***Agradecimentos***

*A Deus, por iluminar meus caminhos.*

*A **minha família**, por terem me proporcionado tudo de melhor e por terem me dado o alicerce para que eu pudesse alcançar meus objetivos.*

*A **Dra. Júlia Salem**, pela sua orientação, amizade, companheirismo, carinho e por acreditar que eu poderia realizar este trabalho.*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)** e a **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pelo financiamento do projeto.*

*A prof<sup>a</sup> **Aya Sadahiro**, pela co-orientação, amizade e por estar sempre disposta a ajudar.*

*A banca examinadora da aula de qualificação composta por, **Dra. Patrícia Puccinelle, Felipe Naveca e Emerson Lima**, que forneceram sugestões valiosas para a execução deste trabalho.*

*A todos os **professores do mestrado** por todo conhecimento passado.*

*A minha grande amiga **Alita Moura**, que esteve sempre ao meu lado me incentivando e me fazendo sorrir.*

*A **Luciana Botinelle, Maurício Ogusko e João Vicente** que sempre estiveram presentes servindo como exemplo de competência, inteligência e organização me auxiliando em todos os passos dados no laboratório de micobacteriologia.*

*A equipe técnica do laboratório de Micobacteriologia do INPA, **Mari, Débora, Rosalvo**, em especial a **Francisco e Raimundo** por estarem sempre dispostos e pacientes me auxiliando na preparação de materiais e reagentes.*

*A equipe de estagiários, **Amaury, Thaís, Érika e Amélia** que sempre se propuseram a ajudar nos momentos mais difíceis.*

*A **Dra. Lúcia Rapp Py-Daniel** que me forneceu uma estante para auxiliar na organização dos tubos de ensaio.*

*A **todos** que ajudaram direta ou indiretamente, meus mais sinceros agradecimentos.*

## RESUMO

A Tuberculose (Tb) é uma doença infecto-contagiosa de caráter mundial, sendo que a demora no seu diagnóstico é um dos fatores que intensificam o número de casos da doença. Os métodos de diagnóstico convencionais demandam tempo e possuem custo elevados, dificultando sua implantação nos laboratórios da rede básica de saúde. Entre os métodos de antibiograma se destaca o método de redução de nitrato (MRN), que propicia um resultado mais rápidos (de 7 a 14 dias) que o método das proporções (MP-28 dias), considerado padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde. O presente trabalho tem como objetivo, avaliar modificações no método de redução de nitrato (MRN), utilizado para verificação da sensibilidade de cepas de *M. tuberculosis* aos principais fármacos administrados na terapêutica da Tb, como alternativa de baixo custo e de fácil realização pela rede básica de saúde na verificação da resistência de Tb. No presente estudo, foi avaliada a acuidade (tabela 2X2) e concordância (concordância observada e índice Kappa) entre o MP, e seis variações de MRN, nas quais foram utilizadas duas fontes de nitrato ( $KNO_3$  e  $NaNO_3$ ), acrescido a três diferentes meios sólidos de cultivo, Middlebrook 7H10, Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa (OG). Os fármacos testados foram isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomicina (STR) e etambutol (EMB) e os testes foram realizados com cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (padrão de sensibilidade), quatro cepas (padrões de resistência diferentes a cada fármaco) e vinte e quatro isolados clínicos com resultado de antibiograma desconhecido. Devido a excelente reprodutibilidade e concordância do MRN original com o MP para os quatro fármacos testados pode-se confirmar que o MRN é uma metodologia alternativa na detecção de isolados de *M. tuberculosis* resistente aos principais fármacos utilizados na terapêutica da Tb. O resultado de total concordância do MRN modificado pela substituição do nitrato de potássio pelo nitrato de sódio com o MP e com o MRN original para os fármacos RIF, INH e EMB, indica que a modificação é uma ótima alternativa para a rede básica de saúde, visto que a fonte de nitrogênio é de fácil aquisição pelos serviços de saúde. Além disso, mostrou ser mais rápido na liberação dos resultados. Os resultados do fármaco STR, executado em todas as modificações do MRN, indicam a necessidade de avaliações futuras em suas concentrações, principalmente quando utilizado no meio de OG. O meio Middlebrook apresentou freqüentes contaminações em todos os ensaios realizados, não sendo possível realizar sua análise.

Palavras Chave: Tuberculose, resistência, redução de nitrato.

## ABSTRACT

Tuberculosis (Tb) is an infectious disease of international distribution. Problems in the diagnosis, as time requirement and high costs for implementation in public health care, increases the number of the disease cases. Specifically about the most important antibiogram assays, the “nitrate reduction assay” (MRN) provides faster results (7 to 14 days) than the “proportion method (MP)” (28 days), however this last one is considered as “gold standard” by the World Health Organization. The aim of this work was to evaluate modification in the method of nitrate reduction (MRN), used to check the sensitivity of *M. tuberculosis* strains to primary drugs administered for the treatment of TB, as an alternative to reduce costs and to simplify this methodology, in order carry out it in the primary health care to verify the resistance of TB. It was evaluated the accuracy (2X2 table) and agreement (observed agreement and Kappa) between the MP and six variations of NRM: two sources of nitrate (NaNO<sub>3</sub> and KNO<sub>3</sub>); and three different media for solid cultivation (Middlebrook 7H10, Löwenstein-Jensen and Ogawa). The drugs evaluated were: isoniazid (INH), rifampicin (RIF), streptomycin (STR) and ethambutol (EMB); and the tests were conducted with: a strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (standard sensitivity), four resistant strains (different patterns of resistance to each drug) and twenty-four clinical isolates with unknown antibiotic susceptibility results. Under the studied conditions, excellent reproducibility and agreement was obtained between the original NRM and the MP, confirming that the original NRM is an alternative to antibiogram assays. In the assays carried out with modified MRN (potassium nitrate was substituted by sodium nitrate) it was obtained faster results and full agreement comparing with the results of the MP and the original MRN, indicating that this modified medium could be used in antibiogram assays in the basic care health, since sodium nitrate is a nitrogen source cheaper and more easily obtained. The result of the assays using STR, in all variations of the MRN, indicates that are necessary further evaluation, especially using OG medium. The Middlebrook medium presented recurrent contamination making impossible to carry out analysis.

Key words: Tuberculosis, resistance, nitrate reduction

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Estrutura da parede celular de micobactérias.....	19
<b>Figura 2</b>	Sítio de ação dos fármacos INH, RIF, EMB e STR no <i>M. tuberculosis</i> .....	24
<b>Figura 3.</b>	Fluxo de procedimentos para a realização do MRN e método das proporções .....	35
<b>Figura 4.</b>	Fluxo de atividades para a realização do Método da Redução de Nitrato....	37
<b>Figura 5.</b>	Fluxo de procedimentos para a realização do Método das Proporções .....	39
<b>Figura 6.</b>	Distribuição dos isolados conforme do tempo de leitura no MRN, original e modificado.....	49

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Resultados dos antibiogramas entre o Método das Proporções (MP) e o Método da Redução do nitrato (MRN), original e modificado .....	42
<b>Tabela 2</b>	Resultados dos antibiogramas entre o MRN original e os MRN modificados.....	47
<b>Quadro 1</b>	Metodologias atuais utilizadas para diagnosticar cepas micobacterianas resistentes aos fármacos.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>BK</b>	Bacilo de Kock
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CTA</b>	Comitê Técnico Acessor
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EMB</b>	Etambutol
<b>g/mL</b>	Gramas por mililitro
<b>°C</b>	Grau Célsius
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>H<sub>37</sub>Rv</b>	Cepa virulenta do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
<b>INH</b>	Isoniazida
<b>IUATLD</b>	International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de potássio
<b>LJ</b>	Lowenstein-Jensen
<b>LJ-NaNO<sub>3</sub></b>	Lowenstein-Jensen com nitrato de sódio
<b>LJ-KNO<sub>3</sub></b>	Lowenstein-Jensen com nitrato de potássio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MRN</b>	Método da Redução de Nitrato
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MGIT</b>	Mycobacteria Growth Indicator Tube
<b>MODS</b>	Micoscopic Observation Drug Susceptibility
<b>MR</b>	Multirresistente
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de sódio
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de potássio
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitrato
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitrito
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>OFX</b>	Ofloxacina
<b>OG</b>	Ogawa
<b>OG-NaNO<sub>3</sub></b>	Ogawa com nitrato de sódio
<b>OG-KNO<sub>3</sub></b>	Ogawa com nitrato de potássio
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline (solução salina tamponada com fosfato)
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PNCT</b>	Programa Nacional de Controle da tuberculose
<b>PZA</b>	Pirazinamida

<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>RNA<sub>r</sub></b>	Ácido ribonucléico ribossômico
<b>RNA<sub>t</sub></b>	Ácido ribonucléico transportador
<b>STR</b>	Estreptomicina
<b>Tb</b>	Tuberculose
<b>TRZ</b>	Tiridizon
<b>TbMR</b>	Tuberculose Multirresistente
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>WHO</b>	World Health Organization – Organização Mundial de Saúde
<b>XDR-TB</b>	Extensively Drug Resistant Tuberculosis

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
<b>2.1</b>	<b>A Tuberculose</b>	15
<b>2.2</b>	<b>O bacilo e a resistência aos fármacos</b>	18
<b>2.3</b>	<b>Mecanismo de resistência aos fármacos</b>	21
2.3.1	Estreptomicina (STR)	21
2.3.2	Rifampicina (RIF)	21
2.3.3	Etambutol (EMB)	22
2.3.4	Isoniazida (INH)	23
<b>2.4</b>	<b>Multirresistência – um sério problema atual</b>	25
<b>2.5</b>	<b>Métodos de sensibilidade aos fármacos</b>	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	33
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	34
<b>4.1</b>	<b>Modelo de Estudo</b>	34
<b>4.2</b>	<b>Universo de Estudo</b>	34
4.2.1	Cepas e Isolados de <i>M. tuberculosis</i> analisados	34
<b>4.3</b>	<b>Fluxo de Atividades</b>	35
<b>4.4</b>	<b>Detalhamento dos Procedimentos</b>	36
4.4.1	Preparação dos meios de cultivo	36
4.4.2	Ativação das cepas de isolados micobacterianos	36
4.4.3	Realização do Método das Proporções (padrão ouro)	37
4.4.4	Execução do Método da Redução de Nitrato em meio de Middlebrook 7H10, Lowenstein-Jensen e Ogawa	38
<b>4.5</b>	<b>Análise dos Resultados</b>	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
<b>5.1</b>	<b>Análise entre o Método das Proporções (MP) e o Método da Redução do Nitrato (MRN), original e modificados</b>	42
<b>5.2</b>	<b>Análise do MRN original com o MRN modificado</b>	47
<b>5.3</b>	<b>Análises do tempo de leitura do MRN, original e modificado</b>	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	51
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	52
	<b>APÊNDICES</b>	59
	<b>ANEXOS</b>	65

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos aspectos mais problemáticos para o controle da Tuberculose (Tb), seja na sua morbidade como mortalidade, tem sido o surgimento de cepas resistentes a fármacos que dão origem a chamada Tuberculose multirresistente (TbMR). Esse problema de caráter mundial traz sérias dificuldades aos programas de controle da doença, pois representa uma ameaça aos pacientes devido à toxicidade do tratamento e baixas taxas de cura, e para seus contatos pela transmissão de bacilos resistentes (WHO, 2008; 2009). Assim, é fundamental o estudo de técnicas rápidas, de fácil execução e implantação na rede básica de saúde, que possam servir para diagnosticar precocemente a TbMR e quebrar a cadeia de transmissão dos bacilos resistentes.

Os métodos convencionais de determinação de resistência a fármacos por cepas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* demandam um prolongado tempo para a finalização dos resultados. Tem-se, por exemplo, o método das proporções que é considerado padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2008), porém requer um período de 4 a 6 semanas para emissão dos resultados. Outros métodos, que podem fornecer resultados mais rápidos, apresentam um custo elevado, como os automatizados utilizando radioisótopos, os métodos moleculares de seqüenciamento, e também os que utilizam ensaios colorimétricos (PALOMINO et al., 2008). Os custos elevados inviabilizam suas utilizações em rede básica de saúde, especialmente, nos países em desenvolvimento onde a Tb e os casos de resistência aos fármacos são freqüentes. Entretanto, quanto mais rápido e preciso for o diagnóstico desses casos, mais cedo se poderá monitorar o tratamento dos pacientes e realizar novas associações de fármacos para evitar a disseminação de cepas multirresistentes e obter a cura do maior número de pacientes.

Visando diminuir os custos e o tempo na emissão dos resultados dos testes de

sensibilidade aos fármacos, algumas pesquisas propõem o método da redução do nitrato (MRN), que consiste na redução do nitrato ao nitrito durante o desenvolvimento do *M. tuberculosis*, revelado pela modificação da coloração do meio de cultivo. Essa indicação é constatada no 7º dia e reconfirmada ao 10º e 14º dia de desenvolvimento dos cultivos (ÄNGEBY et al., 2002). Conseqüentemente, os resultados podem ser obtidos mais rapidamente quando comparados ao método das proporções, que necessita de no mínimo 28 dias para visualização das colônias micobacterianas e liberação do laudo.

A importância científica do MRN está em sua rapidez e na comprovada acuidade na detecção de cepas resistentes em várias regiões do mundo (Suécia, Noruega, Turquia, Bélgica, Argentina, Peru, Índia e Brasil), onde foi testado (MARTIN, et al., 2008; SHIKAMA et al., 2009). O MRN é rápido, de fácil execução e não necessita de equipamento específico. No entanto, utiliza no meio de cultivo sólido o reagente nitrato de potássio, que por ser um produto controlado pelo Ministério da Defesa pode dificultar a implantação do método na rede básica de saúde devido à demora na liberação do reagente.

O MRN também pode ser realizado em meio líquido (SYRE et al, 2003), mas neste caso utiliza-se o reagente nitrato de sódio, produto esse facilmente obtido pela rede básica de saúde. Entretanto, em meio líquido tem-se uma maior contaminação por outros microrganismos que não as micobactérias, propiciando uma maior taxa de perdas das amostras clínicas.

Considerando as dificuldades na aquisição do nitrato de potássio, a fácil contaminação de cultivos em meio líquido e a necessidade emergencial na implantação de métodos laboratoriais que auxiliem no controle da Tb multirresistente, propõe-se avaliar o MRN com o reagente nitrato de sódio, que é de fácil aquisição, incorporado a três diferentes meios de cultivo sólidos, como alternativa de baixo custo e de fácil realização para a determinação da sensibilidade aos antimicobacterianos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A Tuberculose

A Tuberculose (Tb) convive com o homem desde o início de sua história. É uma doença infecto-contagiosa, causada por quatro espécies de bactérias que tem a forma de bastonetes, pertencentes ao gênero *Mycobacterium*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Estas espécies estão agrupadas e definidas como “complexo *M. tuberculosis*”. No Brasil quase todos os casos têm como agente etiológico o *M. tuberculosis*, conhecido como bacilo de Koch (BK) devido sua morfologia e em homenagem a seu descobridor Robert Koch, em 1882 (GANGADHARAM, 1998).

A Tb é considerada uma doença de grande importância na saúde pública, e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), foram estimados 9,4 milhões de casos novos de Tb, 1,3 milhões de óbitos em 2008. O Brasil ocupa a 18ª posição com o maior número de casos da América Latina, tendo incidência de 49/100.000 habitantes em 2007 para todas as formas de Tb (WHO, 2009). As regiões que mais se destacam por apresentarem altos coeficientes de incidência de Tb são o Sudeste e o Norte do Brasil, tendo o estado do Rio de Janeiro com 66,56/100.000 hab. e o Amazonas com 68,93/100.000 hab, respectivamente (BRASIL, 2009).

Além desses altos índices, a doença se torna mais agravante devido se expressar não só na forma pulmonar, mas também, por apresentar as formas disseminadas como a miliar ou extrapulmonar classificadas segundo a localização: pleural, ganglionar periférica, osteoarticular, geniturinária e meningocefálica. Porém 90% dos casos de Tb são pulmonares (SBPT, 2004).

O bacilo causador da Tb é mais comumente transmitido por aerossóis de secreções pulmonares, onde gotículas de saliva são expelidas no ar, pela tosse, espirro e fala. Na pessoa sadia que ingere ou inala essas gotículas e dependendo da carga de bacilos infectantes e de sua imunidade, ocorre um processo inflamatório levando ao aparecimento de uma lesão inicial no parênquima pulmonar, como um nódulo característico denominado de tubérculo, do latim “pequeno nódulo” (SCHLOSSBERG, 2005).

O quadro clínico típico da Tb pulmonar tem como sintoma principal a tosse, que começa quase imperceptivelmente e vai se intensificando com a evolução da doença, seguida por astenia, anorexia, febre vespertina, geralmente em torno de 38°C, e sudorese noturna, sendo que, nas formas mais graves pode evoluir propiciando quadros de hemoptise e insuficiência respiratória (CIMERMAN; CIMERMAN, 2003; ALA, 2008).

O tratamento do paciente é a ação prioritária de controle da Tb, uma vez que permite anular rapidamente as maiores fontes de infecção. Poucos dias após o início da terapêutica correta, os bacilos da Tb praticamente perdem seu poder infeccioso (OMS, 2008).

No Brasil, desde 1979 o Ministério da Saúde (MS) através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) propõe alguns esquemas de tratamento que são adaptados de acordo com cada caso clínico (SBPT, 2004). Recentemente o Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde (CTA/PNCT/MS) emitiu uma nota técnica com modificações nos referidos esquemas de tratamento da Tb, devido aos dados do II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos anti-Tb (2007-2008), que apresentaram um aumento da taxa de resistência primária à isoniazida (INH) de 3,5% para 6,0% e à rifampicina (RIF) de 0,2% para 1,5%, entre os anos de 1997 relacionado ao I Inquérito Nacional de Resistência e 2007 (SBPT, 2009). A principal modificação refere-se ao acréscimo do etambutol (EMB) ao esquema anterior composto por INH, RIF e pirazinamida (PZA). A escolha do EMB teve por base estudos realizados na década de 60 e 70, onde a RIF

e EMB associados com INH, apresentaram capacidade de reduzir a falência de tratamento devido à seleção de cepas resistentes (MITCHISON, 2005b). Entretanto, vale salientar que a adição do EMB não altera as taxas de recidivas ou falências em paciente que apresentam outros padrões de resistência (MITCHISON, 1998).

Segundo a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT, 2009), além do acréscimo do EMB e com o objetivo de aumentar a adesão ao tratamento pela diminuição do número de comprimidos a serem ingeridos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), recomendaram a combinação dos fármacos anti-Tb com doses fixas no mesmo comprimido. Assim, o tratamento básico atual para Tb compreende a ingestão diária de um comprimido ao dia, durante dois meses, contendo RIF, INH, PZA e EMB (fase intensiva) e quatro meses ingerindo um comprimido/dia contendo RIF e INH (fase de manutenção). Esse esquema é indicado para o tratamento dos casos novos de Tb pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), bem como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono. Para os casos de pacientes que não são curados com os esquemas referidos, os chamados portadores de Tb multirresistentes (TbMR), o esquema padronizado é composto de cinco medicamentos - STR (estreptomicina), EMB, OFX (ofloxacina), PZA e TRZ (tiridizon) - na fase intensiva e três medicamentos (EMB, OFX e TRZ) na fase de manutenção (SBPT, 2009). Destes medicamentos, a STR deverá ser utilizada 5 dias por semana nos 2 primeiros meses, seguido de 3 vezes por semana nos 4 meses subseqüentes. O regime de tratamento deve ser supervisionado, com duração de 18 meses, e acompanhado em uma unidade de referência terciária (WHO, 2008; SBPT, 2009).

A resistência do bacilo da tuberculose aos fármacos é dependente de sua taxa natural de mutação e da seleção durante o tratamento, quer porque ele é administrado de forma irregular, quer porque é inadequado (DAVID, 1984). Também é dependente da própria estrutura e composição da célula micobacteriana, que pode impedir a ação de um fármaco.

## 2.2 O bacilo e a resistência aos fármacos

As micobactérias são bacilos tipicamente curvos ou ligeiramente dobrados, delgados, com cerca de 2 a 4 $\mu$ m de comprimento por 0,2 a 0,5 $\mu$ m de largura. Frequentemente apresentam-se com grânulos irregulares espaçados, com vacúolos não corados ou com pontos fortemente corados (RATTAN et al., 1998). Possuem metabolismo voltado especialmente para a construção da parede, que a protege de agentes químicos. O bacilo é aeróbio, duplica sua população em 18 a 48 horas, dependendo da maior ou menor oferta de oxigênio, do pH do meio e do acesso aos nutrientes. Entretanto, é facilmente destruído por agentes físicos como o calor, os raios ultravioletas da luz solar e radiação ionizante (VERONESI; FOCACCIA, 2005).

A estrutura principal de uma célula micobacteriana é sua parede celular, de aproximadamente 20 nm de espessura. Quimicamente a parede é muito complexa e bem diferente das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Possuem externamente cadeias complexas de polissacarídeos e lipídios, sendo alguns exclusivos das micobactérias, e que produzem efeitos biológicos relevantes sobre o hospedeiro (SATO, 2007).

A parede celular é composta por três macromoléculas: peptidoglicanos, arabinogalactanos (complexo polissacarídeo covalente unido ao peptidoglicano) e ácido micólico (RATTAN et al., 1998).

Os ácidos micólicos, um dos componentes mais característicos da parede micobacteriana, são extensas cadeias de ácidos graxos de 70 a 80 átomos de carbono, perpendiculares à superfície da célula, os quais conferem hidrofobicidade à membrana e a convertem em uma efetiva barreira contra nutrientes hidrofílicos e antibióticos (PFYFFER, 2000). Além disto, a partir da análise do perfil de ácidos micólicos é possível realizar sua identificação fenotípica (BRASIL, 2008). Na Figura 1 está a representação esquemática da

parede celular das micobactérias.

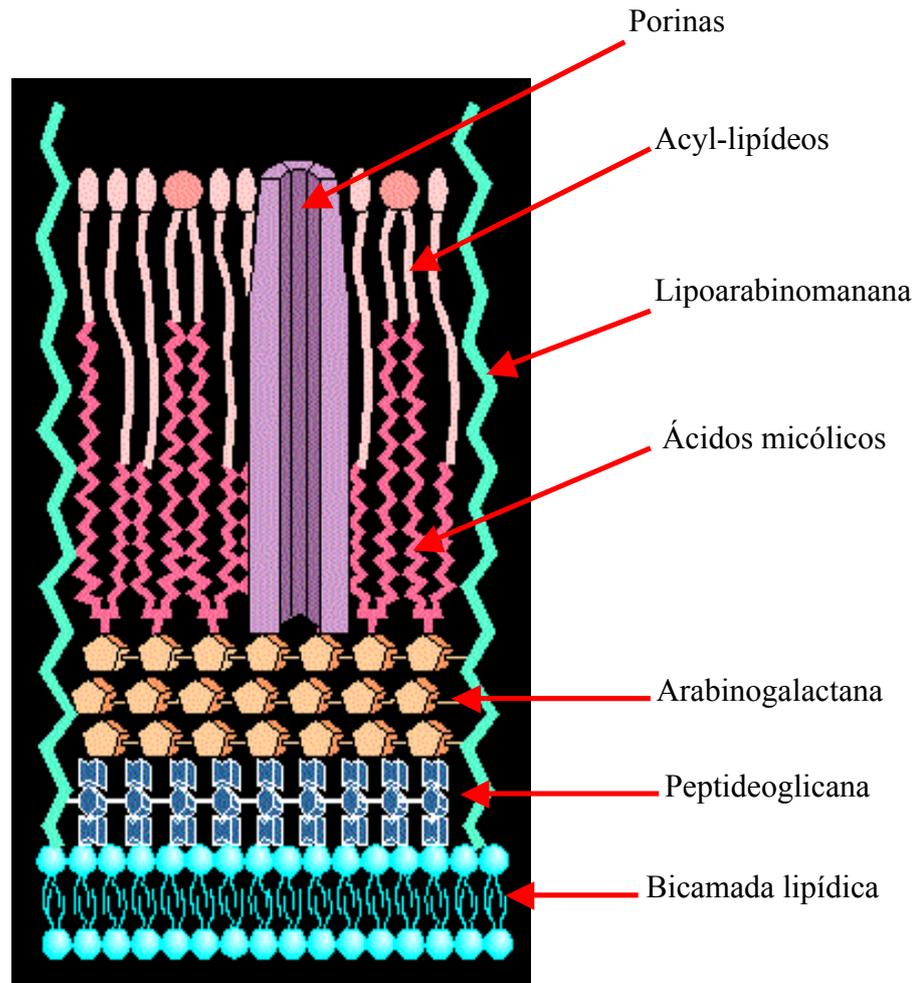


Figura 1. Estrutura da parede celular das micobactérias.

Fonte: <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html>

A porina da parede celular micobacteriana é de natureza protéica e constitui uma rota de entrada de pequenas moléculas de antibióticos hidrofílicos como a INH. As moléculas grandes hidrofóbicas como a RIF e os macrolídeos se dissolvem na fase lipídica permitindo o contato com a fase aquosa no interior da célula. Muitos fármacos efetivos contra micobactérias mostram hidrofobicidade variável. Estudos *in vitro* demonstram que os derivados hidrofóbicos de aminoglicosídeos são mais ativos contra *M. tuberculosis* do que a maioria dos derivados hidrofílicos (JARLIER; NIKAIDO, 1990; RATTAN et al., 1998; SATO, 2007).

De acordo com Luna (2001), todos os bacilos que formam uma colônia, apesar de procederem de uma só célula (clone), não tem um comportamento homogêneo frente aos fármacos antibacilares. E assim, a partir de um número de bacilos surgem mutantes naturalmente espontâneos que se comportam como resistentes frente a alguns dos fármacos.

O mecanismo de resistência do *M. tuberculosis* ocorre por mutações, não havendo indicação de transferência plasmidial ou transposons. Em outras micobactérias, a maioria apresenta uma resistência natural a todos os fármacos, provavelmente devido à estrutura da parede celular, que atuaria como uma barreira. Devido a esses fatos, em estudos de resistência a Tb é considerada separadamente das outras micobacterioses (BRASIL, 2008).

O *M. tuberculosis* possui um tempo prolongado de crescimento e capacidade para entrar em latência devido à queda de sua atividade metabólica, sendo este fato um dos responsáveis pela dificuldade da ação dos antimicrobianos. Além disso e de acordo com o pH tecidual e a composição das células humanas, os antimicrobianos também apresentam uma atividade diferenciada (GILLESPIE, 2002). Desta maneira, no interior dos macrófagos, agem melhor os fármacos que se difundem para o meio intracelular e que atuam em pH ácido como a RIF, a PZA e o EMB (COLL, 2003). Nas lesões fechadas e caseosas, nas quais existe um crescimento bacilar intermitente, o fármaco mais eficaz e que tem maior poder de ação é a RIF. A INH também é eficaz neste caso, porém, a sua atuação é mais lenta. Quando os bacilos se multiplicam nas paredes das cavernas que são formadas a partir da liquefação do material caseoso, proporcionam maior eficácia dos fármacos como a INH, RIF e STR. Estes parâmetros justificam o uso de esquema tríplice preconizado para o tratamento da Tb (GILLESPIE, 2002). De acordo com Espinal, (2003), apesar da eficiência dos esquemas terapêuticos, nos últimos anos tem-se observado, em nível mundial, um aumento na incidência de Tb causada pelo *M. tuberculosis* resistente aos principais fármacos.

## 2.3 Mecanismos de resistência aos fármacos

### 2.3.1 Estreptomicina (STR)

A STR foi o primeiro antibiótico a ser utilizado contra o *M. tuberculosis*. É um aminoglicosídeo que interrompe a decodificação de aminoacil-RNAt, portanto inibe a síntese protéica bloqueando a tradução do RNAm ou causa má interpretação da mensagem durante tradução (WADE; ZANG, 2004). De acordo com Honore et al., (1993) um dos mecanismos mais comuns para aquisição de resistência a STR é a acetilação do fármaco por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos adquiridos via plasmídios e transposons. No entanto, este mecanismo não é encontrado em *M. tuberculosis*. Em vez disso, a resistência à STR é atribuída, pelo menos parcialmente, a duas distintas classes de mutações, incluindo as mutações pontuais na proteína ribossomal S12 (*rpsL*) e no 16S RNAr (*rrs*) (RATTAN et al., 1998; COLL, 2003). As mutações que afetam o gene *rpsL* são observadas entre 52 a 59% das cepas resistentes e produzem uma resistência de alto nível (CIM>500 µg/mL), ocorrendo devido a substituição no códon 43 da lisina pela arginina (WADE; ZANG, 2004). A maior parte das mutações em *rrs* ocorrem nas alças do RNAr 16S, sendo agrupadas em duas regiões que contêm em torno de 530 e 915 nucleotídeos (COLL, 2003). Isolados com baixo nível de resistência a STR podem não mostrar mutações nos marcadores e apresentar alterações na permeabilidade celular que afeta a incorporação da STR no interior da célula (MEIER et al., 1996).

### 2.3.2 Rifampicina (RIF)

A RIF é um derivado semi-sintético do 3,4-(metilpiperazinil-iminometilidine)-rifamicina SV, que foi introduzida na terapêutica da tuberculose desde 1972. Apresenta intensa ação bactericida sobre as células metabolicamente ativas, difundindo-se facilmente pelo envoltório celular de *M. tuberculosis*. Age também sobre os bacilos no período de

latência, tanto nos focos necróticos quanto no interior dos macrófagos (COLL, 2003). Seu mecanismo de ação é semelhante às demais rifamicinas, sendo um potente inibidor da síntese de RNA mensageiro (RNAm). O fármaco se liga fortemente à subunidade  $\beta$  da enzima RNA polimerase DNA-dependente codificada pelo gene *rpoB*. Mutações neste gene geram altos níveis de resistência a RIF (SOMOSKOV et al., 2001; COLL, 2003), impedindo o fármaco a se ligar a RNA polimerase, fazendo com que a bactéria não seja inibida pelo fármaco. Mais de 95% das cepas resistentes a RIF, apresentam mutações na região 81 pb do gene *rpoB*. As mutações que não ocorrem neste gene, podem ocorrer na região amino terminal, assim como mudanças na permeabilidade da membrana que afetam a incorporação do fármaco (COLL, 2003; ZHANG, 2005). As mutações mais comuns alteram o códon His526 e Ser531, resultando em altos níveis de resistência a RIF (CIM>32  $\mu$ m) (SOMOSKOVI et al., 2001).

### 2.3.3 Etambutol (EMB)

O EMB dextro-2,2'-(etilenodiamina)-di-1-butanol é um derivado da etilenodiamina. O mecanismo de ação se dá por inibição da biossíntese do arabinogalactano, o maior polissacarídeo da parede celular das micobactérias (TAKAYAMA et al., 1989). É ativo frente ao *M. tuberculosis* com CIM de 1 a 5  $\mu$ g/mL (WADE; ZANG, 2004). Possui uma atividade variável sobre as demais micobactérias de crescimento lento e atividade muito menor nas espécies de crescimento rápido (COLL, 2003). A interrupção da síntese de arabinogalactano altera a barreira celular aumentando a atividade de fármacos lipofílicos como a rifampicina e a ofloxacina, que atravessam a parede celular principalmente em domínios lipídicos dessa estrutura (SREEVATSAN et al., 1997). O EMB inibe de forma específica a biossíntese da parede micobacteriana. Assim a resistência está associada a mudanças em uma região genômica definida, o operon *embCAB*, que codifica a arabinosil transferase (*EmbC*, *EmbA* e *EmbB* em *M. tuberculosis*) que é relacionada com a síntese de componentes da parede celular,

como o arabinogalactano e o lipoarabinomanano (SREEVARSAN et al., 1997; WADE; ZANG, 2004; ZHANG et al., 2005). É de grande importância o sinergismo entre o EMB e a STR quando ambos se combinam durante o tratamento; o EMB em sua ação desestabilizadora da parede micobacteriana produz pequenos poros que favorecem que a STR penetre no interior da célula (RATTAN et al., 1998).

#### 2.3.4 Isoniazida (INH)

A hidrazida do ácido nicotínico ou isoniazida (INH) foi descoberta em 1912, porém, somente em 1951 foi reconhecida a sua potente ação contra a tuberculose (COLE et al., 1994). O CIM da INH contra bactérias de crescimento lento é de 0,05 g/ml, porém este fármaco é 100 vezes menos ativo contra bactérias de crescimento rápido como *M. smegmatis*. Penetra na célula micobacteriana através de difusão passiva e é bactericida apenas em bacilos em replicação ativa, limitando seu papel nas populações que se replicam lentamente como as que são encontradas no interior dos macrófagos (COLL, 2003; VICHEZE; JACOBS, 2007).

O complexo *M. tuberculosis* geralmente é sensível a INH, já em outras micobactérias o seu papel é bastante limitado (COLL, 2003). Além disso, a INH é um pro-fármaco que requer ativação “*in vivo*” produzindo um potente derivado capaz de oxidar ou acilar grupos protéicos que, por sua vez, atuam na síntese dos ácidos micólicos presentes na parede do *M. tuberculosis* (SOMOSKOVI et al., 2001). As mutações podem ocorrer em vários genes sendo o mais importante o *KatG* (32-93% dos casos) e a região promotora do gene *inhA* (15%). A INH para ser ativada necessita da enzima catalase-peroxidase que é codificada pelo gene *KatG*, ocorrendo a produção de radicais reativos de oxigênio (superóxidos, peróxidos de hidrogênio e peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácidos micólicos da parede bacilar e produzem dano no DNA (ZANG et al., 1992; RATTAN et al., 1998; COLL, 2003). A principal mutação no gene *KatG* é no códon 315 pela substituição do aminoácido

serina (AGC) por treonina (ACC), com diminuição da ação da catalase, o que resulta em resistência à INH. O gene *inhA* codifica a proteína carreadora de ácidos graxos (enoil-ACP redutase NADH dependente), que é essencial na síntese de ácido micólico da parede celular. A INH ativada se liga à NADH e inibe a atividade da enzima NADH dependente, resultando em morte da bactéria, por interferência na síntese do ácido micólico. A mutação do gene *inhA* modifica a enzima, que perde afinidade pelo NADH, resultando em resistência à INH. A importância de outros genes, como *kasA*, *mabA*, *ndh* e a região intergênica *oxiR-ahpC* (alquil hidroxidoredutase), que é um intermediário tóxico da INH, não está bem estabelecida e necessita de outros estudos (LEE et al, 2001; COLL, 2003; VICHEZE; JACOBS, 2007). Os sítios de ação dos fármacos STR, RIF, EMB e INH, estão ilustrados na Figura 2.

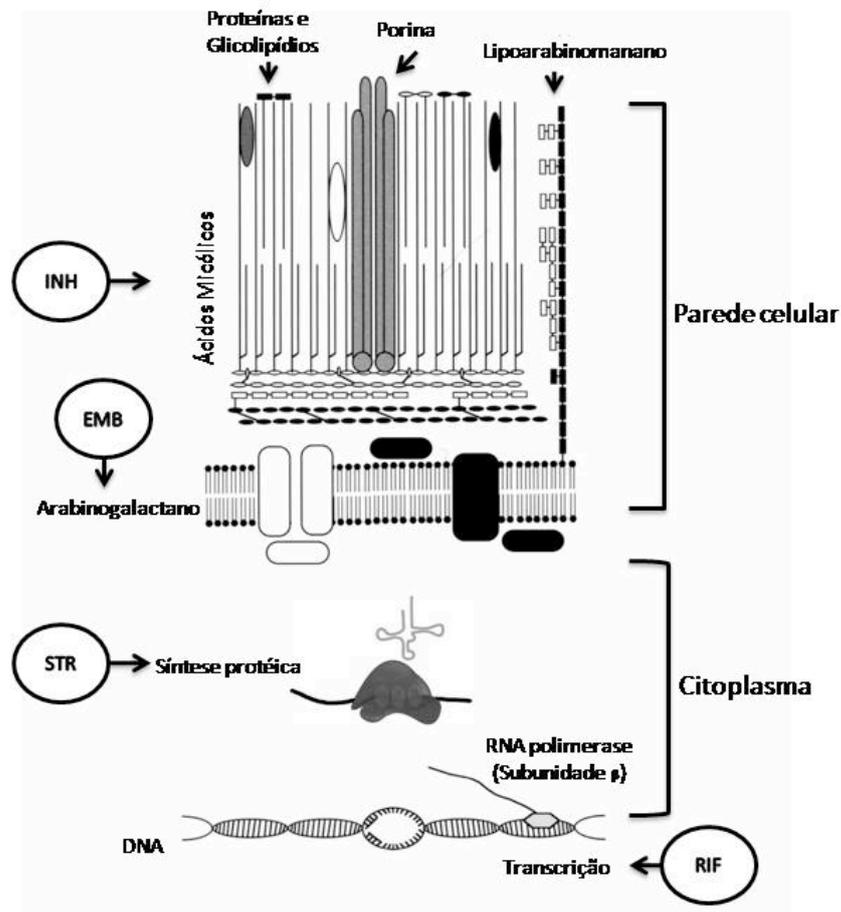


Figura 2. Sítios de ação dos fármacos INH, RIF, EMB e STR no *M. tuberculosis*.  
Fonte: Somoskovi et al. (2001).

## 2.4 Multirresistência – um sério problema atual

De acordo com a American Lung Association (2008), o conceito de TbMR diz respeito a cepas de *M. tuberculosis* resistentes concomitantemente a INH e RIF ou mais fármacos utilizados no tratamento da doença. Além do aumento no número de casos de TbMR em diversas regiões do mundo, a partir de 2006, surgiu a forma denominada Tb extensivamente resistente (XDR-Tb: *extensively drug resistant tuberculosis*), já descrita em 47 países (DALCOLMO et al., 2007; WHO, 2007; COHEN et al., 2008). Esta linhagem é caracterizada por ser concomitantemente resistente a INH, RIF, a qualquer fluorquinolonas e a pelo menos um dos três fármacos injetáveis de segunda linha - capreomicina, kanamicina e amicacina (SHAH et al., 2007; COHEN et al., 2008). Em inquérito realizado entre 2000 e 2004, incluindo 49 países, 20% das cepas de *M. tuberculosis* eram TbMR, das quais 2% eram de XDR-Tb. (CDC, 2006)

O protocolo do II Inquérito Nacional brasileiro de sensibilidade aos fármacos em Tb caracteriza dois tipos de resistência: a primária, definida como a presença de organismos resistentes a um ou mais fármacos em pacientes que nunca foram tratados para Tb ou que foram tratados por menos de um mês; e a adquirida definida como a presença de organismos resistentes a um ou mais fármacos em pacientes tratados para Tb por um mês ou mais, sendo que estão inclusos os casos de recidiva após abandono e de falência de tratamento (BRASIL, 2008). Conforme esses conceitos, em 2007 foram notificados, pela OMS, 500 mil casos de TbMR e em 2008 aproximadamente 30 mil casos de TbMR na maior parte dos países europeus e da África do sul, correspondendo a 11% do total de casos notificados no mundo (WHO, 2009). No Brasil, as notificações mais atuais são de 2006, estimando 105.220 casos de Tb, destes 1.464 casos de TbMR sendo 852 casos novos e 612 casos reincidentes (WHO, 2008).

De acordo com a WHO (2008), vários fatores contribuem para que a resistência aos fármacos seja disseminada, tais como: a falta de um regime terapêutico unificado; a carência ou ineficiência dos programas de controle da doença; administração incorreta dos medicamentos e a não aderência do paciente ao tratamento prescrito. Deve ser considerada ainda, a substituição de fármacos devido aos efeitos adversos, havendo mudanças precipitadas nos esquemas terapêuticos (BRASIL, 2002).

Estudos de resistência aos fármacos no Brasil refletem a alta frequência de transmissão de cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Em regiões onde a prevalência de Tb e a de cepas resistentes é baixa, podem não representar sérias conseqüências. Entretanto, a alta frequência de cepas resistentes em regiões de grande endemicidade de Tb, pode conduzir à falência do tratamento e comprometer seriamente as metas do programa de controle da Tb (SBPT, 2004). No Amazonas, o estudo de Salem et al. (1990), pioneiro na investigação de resistência aos esquemas de fármacos utilizados no tratamento da Tb, indicou altos níveis de resistência das cepas de *M. tuberculosis*, apresentando 25,3% de resistência em casos novos de Tb a pelo menos um fármaco, e 2,3% de TbMR.

Os métodos laboratoriais de sensibilidade têm um papel primordial no monitoramento da resistência aos fármacos específicos e na seleção da terapêutica de pacientes infectados com cepas MR.

## **2.5 Métodos de sensibilidade aos fármacos**

É necessário conhecer o padrão de sensibilidade das cepas para fornecer o tratamento adequado (ROSSETTI et al., 2002). Nesse sentido, a principal característica dos métodos de sensibilidade é conseguir diferenciar cepas sensíveis e resistentes, sendo a concentração do fármaco o principal ponto a fazer a distinção (HEIFETS; CANGELOSI, 1999). Métodos

laboratoriais que forneçam de forma confiável o diagnóstico de resistência das cepas de *M. tuberculosis*, normalmente têm como metas: monitorar a evolução do tratamento quando ocorre resposta insatisfatória e estimar a prevalência de cepas resistentes na população (CANETTI et al., 1963). Os métodos tradicionalmente aceitos são: o método das proporções, o da concentração absoluta e o da taxa de resistência (PALOMINO et al., 2008), sendo o primeiro considerado o padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1996).

O método das proporções foi originalmente descrito por Middlebrook e Cohan, em 1958, e depois modificado como recomendado pela International Union Against Tuberculosis (CANETTI et al., 1963; KENT; KUBICA, 1985; WHO, 1996). Este método consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra clínica de pacientes, frente à determinada concentração de um fármaco, capaz de inibir o desenvolvimento apenas das células sensíveis (LUNA, 1989; BRASIL, 2008). Entretanto, tem o inconveniente de necessitar de um período de 4 a 6 semanas para emissão dos resultados (CANETTI et al., 1969).

Devido ao longo tempo para liberação do laudo de sensibilidade pelos métodos tradicionais, assim como a dificuldade na aplicação de novas técnicas moleculares na rotina laboratorial, recentes pesquisas (CANETTI et al., 1963; PALOMINO et al., 2008) estão propondo a implantação de métodos alternativos e rápidos para a detecção de *M. tuberculosis* resistente aos fármacos específicos. Neste contexto, vários métodos moleculares e fenotípicos têm sido avaliados.

Os métodos moleculares têm mostrado promissoras possibilidades de determinação rápida de resistência microbiana, porém sua implantação requer pessoal habilitado para sua execução. Dentre eles estão os métodos de detecção de ácidos nucleicos realizados por sondas genéticas e por ampliações (ROSSETTI et al., 2005).

Com relação aos métodos fenotípicos, as execuções são simples e também permitem sua aplicabilidade no estudo de sensibilidade aos fármacos. Os principais métodos atualmente descritos estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1

Metodologias atuais utilizadas para diagnosticar cepas micobacterianas resistentes aos fármacos

MÉTODO	MEIO	T/L Dias	CUSTO	PRINCÍPIO
BacT/Alert 3D automatizados	Líquido	4 a 7	Alto	Sensor colorimétrico medindo mudança de pressão (OTU et al., 2008).
Versa TREK (ESP II) Automatizados	Líquido	4 a 8	Alto	Indicador de mudança da pressão devido o crescimento micobacteriano (WOODS et al., 1997).
MODS	Líquido	7 a 9	Baixo	Morfologia da colônia do <i>M. tuberculosis</i> quando crescido em meio líquido (CAVIEDES et al., 2000).
FastPlaque	Sólido	2 a 3	Médio	Bacteriófago (PALOMINO et al., 2008).
E-teste	Sólido	5 a 10	Médio	Indução de uma zona de inibição no meio (HAZBÓN et al., 2000).
Microcolônias ou fina-camada	Sólido	13 (direto)	Baixo	É baseado no método MODS (SHIFERAW et al., 2007; PALOMINO et al., 2008).
MGIT	Líquido	5 a 8	Médio	Colorimétrico - Fluorescência por rutênio (PALOMINO et al., 2008).
Luciferase	Líquido	2 a 3	Médio	Colorimétrico-bioluminescência (CHAUCA et al., 2007)
TK	Sólido	10		Colorimétrico - indicação de crescimento micobacteriano (BAYLAN et al., 2004).
Microensaio Resazurina	Líquido	8		Colorimétrico - indicação de oxido-redução (MARTIN et al., 2003).
MTT	Líquido	3		Colorimétrico - redução de sais (ABATE et al., 1998).
Citometria de Fluxo	Líquido	1		Colorimétrico - fluorescência (REIS et al., 2004).
MRN- Método da Redução do nitrato	Sólido	7 a 12	Baixo	Redução do nitrato ao nitrito (ÄNGEBY et al., 2002).
MRN- Método da Redução do nitrato	Líquido	6,5	Baixo	Redução do nitrato ao nitrito (SYRE et al., 2003; KUMAR et al., 2005a).
Método das Proporções	Sólido	28	Baixo	Proporção de bacilos resistentes (CANETTI et al., 1969).

T/L= Tempo de Leitura; Custo por amostra: Alto= ≥ R\$ 50,00; médio= entre R\$ 11,00 a R\$ 49,00; baixo= ≤ R\$ 10,00.

Dentre os métodos mencionados no Quadro 1, o sistema MGIT – Mycobacteria Growth Indicator Tube automatizado (Becton & Dickinson), disponibilizado no mercado

como alternativa ao sistema Bactec Tb-460, tem mostrado altos valores de sensibilidade e especificidade em detectar resistência a INH e RIF, que são os fármacos mais importantes no tratamento da Tb (PALOMINO et al., 2008). Além do MGIT, no Brasil também está sendo utilizado o MB/BacT (Bio Merieux) conhecido como BacT/Alert 3D, lançado recentemente no mercado internacional (ROSSETTI et al., 2005; OTU et al., 2008). De acordo com Martin et al. (2008), tanto o sistema MGIT quanto BacT/Alert 3D apresentam custos elevados que inviabilizam suas aplicações na rotina laboratorial.

Outro sistema em fase de investigação é o Versa TREK, conhecido como ESP II (Trek diagnostic systems, West Lake, OH). Poucos estudos têm sido avaliados em fármacos de primeira linha, sendo observada uma alta discordância nos resultados para INH. Por esse motivo, trabalhos posteriores são necessários para avaliar a real utilidade deste sistema na rotina laboratorial (RUIZ et al., 2000).

O sistema MODS (microscopic observation drug susceptibility), tem sido testado com fármacos de primeira linha, porém mostrou mais eficiência apenas com INH e RIF. Contudo, apesar de ser um método rápido, são necessários redobrados cuidados de biossegurança na manipulação das amostras (PALOMINO et al., 2008).

De acordo com Palomino (2008), o sistema comercial FastPlaque e o método da luciferase têm metodologia baseada no uso de micobacteriófagos (CHAUCA et al., 2007). O sistema FastPlaque, é bastante preciso em detectar resistência a RIF, não tendo ainda sido estudado com outros fármacos. O método da luciferase, de acordo com a meta análise feita por Pai et al. (2005), apresenta altíssima sensibilidade (100%) e especificidade (89 a 100%). No entanto, estas metodologias não têm sido amplamente aplicadas na rotina laboratorial, provavelmente pelo uso de fagos que exige uma estrutura laboratorial mais complexa e profissionais habilitados para executá-las.

O sistema comercial Eteste (AB BIODISK Solna, Sweden), permite trabalhar com vários antibióticos e uma ampla variedade de espécies microbianas. Estudos mostram

concordância deste método com o das proporções em ágar e com o BACTEC. Sua desvantagem está na utilização de altas concentrações de inóculos de cepas resistentes (HAZBÓN et al., 2000).

Os métodos da Microcolônias ou fina-camada em ágar (morfologia colonial) e o TK (colorimétrico) necessitam de mais estudos que mostrem sua acurácia e aplicação (BAYLAN et al., 2004).

Métodos colorimétricos utilizando indicadores de óxido-redução (Redox) têm sido propostos, permitindo avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos anti-Tb. Os indicadores Redox atualmente utilizados são o Alamar blue, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium) e a resazurina, ambos mostrando altos valores de sensibilidade e especificidade (MARTIN et al., 2003; PALOMINO, 2005; MARTIN et al., 2007). De acordo com Montoro et al. (2005), estes métodos apresentam grandes desvantagens quanto a biossegurança, devido a manipulação das placas de 96 cavidades que geram uma maior quantidade de aerossóis contaminantes.

As novas metodologias descritas favorecem o rápido diagnóstico, porém, os custos elevados de aquisição, manutenção e insumos de equipamentos são empecilhos para a implantação na maioria dos serviços de controle da Tb.

Na busca de métodos com respostas mais rápidas para o diagnóstico de cepas resistentes, várias pesquisas têm proposto a utilização do método da Redução de Nitrato (MRN), considerando-o como um método bastante eficaz, de baixo custo e com a grande vantagem de ser executado em diferentes meios de cultivo e em fármacos de primeira e segunda linha (ÄNGEBY et al., 2002; PANAIOTOV; KANTARDJIEV, 2002; LEMUS et al., 2004; KUMAR et al., 2005b). Esta técnica de caráter fenotípico é baseada na capacidade do *M. tuberculosis* reduzir o nitrato a nitrito (MARTIN et al., 2008) durante o seu desenvolvimento. Assim, cepas resistentes se desenvolvem e reduzem o nitrato existente no

meio de cultivo para a forma de nitrito, que após a adição de revelador propicia uma mudança de coloração do meio de cultivo.

O nitrogênio é de extrema importância para a sobrevivência de várias micobactérias, sendo que, algumas espécies possuem mecanismos de obtenção de nitrogênio a partir de outras substâncias, como é o caso do *M. tuberculosis* que possui uma enzima capaz de reduzir o nitrato ( $\text{NO}_3$ ) em nitrito ( $\text{NO}_2$ ) e posteriormente a nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) (HEDGECOCK; COSTELLO, 1962; RAMAKRISHNAN et al., 1972). Essa reação bioquímica de redução pode ser visualizada através do reagente de Griess (ácido clorídrico (HCl), sulfanilamida, n-1 naftiletilenediamina), que unindo-se ao nitrito presente no meio, dá origem a um derivado ozóico colorido, o parasulfobenzenoato-alfa-naftilamina, indicando que o bacilo fez a redução (SUN et al., 2003). Esta reação pode ser visualizada em torno de 7 a 14 dias de incubação, sendo esse tempo a metade do necessário pela técnica padrão ouro (ÄNGEBY et al., 2002; MARTIN et al., 2008).

Nos trabalhos realizados por Coban et al. (2004), Sethi et al. (2004), Martin et al. (2005), Montoro, et al. (2005) e Shikama et al. (2009) é utilizada a metodologia descrita por Ängeby et al. (2002), executando o MRN acrescido com nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) em meio de cultivo solido de LJ. Nos trabalhos de Kumar et al. (2005a; 2005b), a execução do método é em meio líquido (7H9) utilizando nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ). De acordo com a meta-análise feita por Martin et al. (2008), quando aplicado em meio líquido, o MRN apresenta desvantagem, pois este meio é de fácil contaminação por outros microrganismos que não as micobactérias e pode provocar o surgimento de aerossóis. Porém, apresenta vantagens se executado em meios que fazem parte da rotina laboratorial. Além disso, não necessita de equipamentos sofisticados para sua execução, e os resultados são simples de serem interpretados facilitando sua ampla aplicação (MONTORO et al., 2005). Entretanto, na metodologia descrita por Ängeby et al. (2002) a fonte de nitrato utilizada para a realização do

método é o nitrato de potássio. No Brasil, este composto é controlado pelo Ministério da Defesa, de acordo com o decreto nº 3.665 de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000), fato que dificulta sua utilização na rede básica de saúde. Contudo, para que este método possa ser oferecido à rede básica de saúde, é necessário fazer a substituição do reagente nitrato de potássio pelo nitrato de sódio, que não consta na lista dos produtos controlados por lei. Partindo dessa premissa, e que no Brasil os meios de cultivo mais utilizados são o de LJ e Ogawa, o presente estudo visou avaliar o MRN utilizando o reagente nitrato de sódio nos referidos meios sólidos e em um meio a base de ágar (Middlebrook 7H10), todos acessíveis à rede básica de saúde, como alternativa de baixo custo e de fácil realização para o diagnóstico da Tb multirresistente.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar modificações no método de redução do nitrato (MRN), utilizado para verificação da sensibilidade de cepas de *M. tuberculosis* aos principais fármacos administrados na terapêutica da Tuberculose, como alternativa de baixo custo e de fácil realização pela rede básica de saúde na verificação da existência de tuberculose multirresistente.

### **3.2 Específicos**

- 3.2.1 Verificar a concordância do método das proporções (padrão ouro) com o método do MRN, original e modificado.
- 3.2.2 Verificar se as modificações realizadas no método MRN propiciam a mesma acuidade da técnica original.
- 3.2.3 Analisar em qual dos meios de cultivo utilizados o MRN modificado apresenta maior acuidade e rapidez no resultado.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Modelo de Estudo

Realizou-se um estudo laboratorial do tipo diagnóstico, no qual foi avaliada a acuidade de modificações no método da redução de nitrato (MRN), para verificação de sensibilidade do *M. tuberculosis* aos fármacos dos esquemas de tratamento da Tuberculose (Rifampicina – RIF, Isoniazida – INH, Etambutol – EMB e Estreptomicina –STR). Nas modificações utilizou-se diferentes meios de cultivos e fontes de nitrato.

O presente estudo fez parte do projeto de pesquisa “Análise de Métodos Bacteriológicos e Moleculares na identificação de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos fármacos dos esquemas terapêuticos de combate a Tuberculose”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional em Pesquisas da Amazônia (CEP-INPA), número do processo 104/2006.

### 4.2 Universo de Estudo

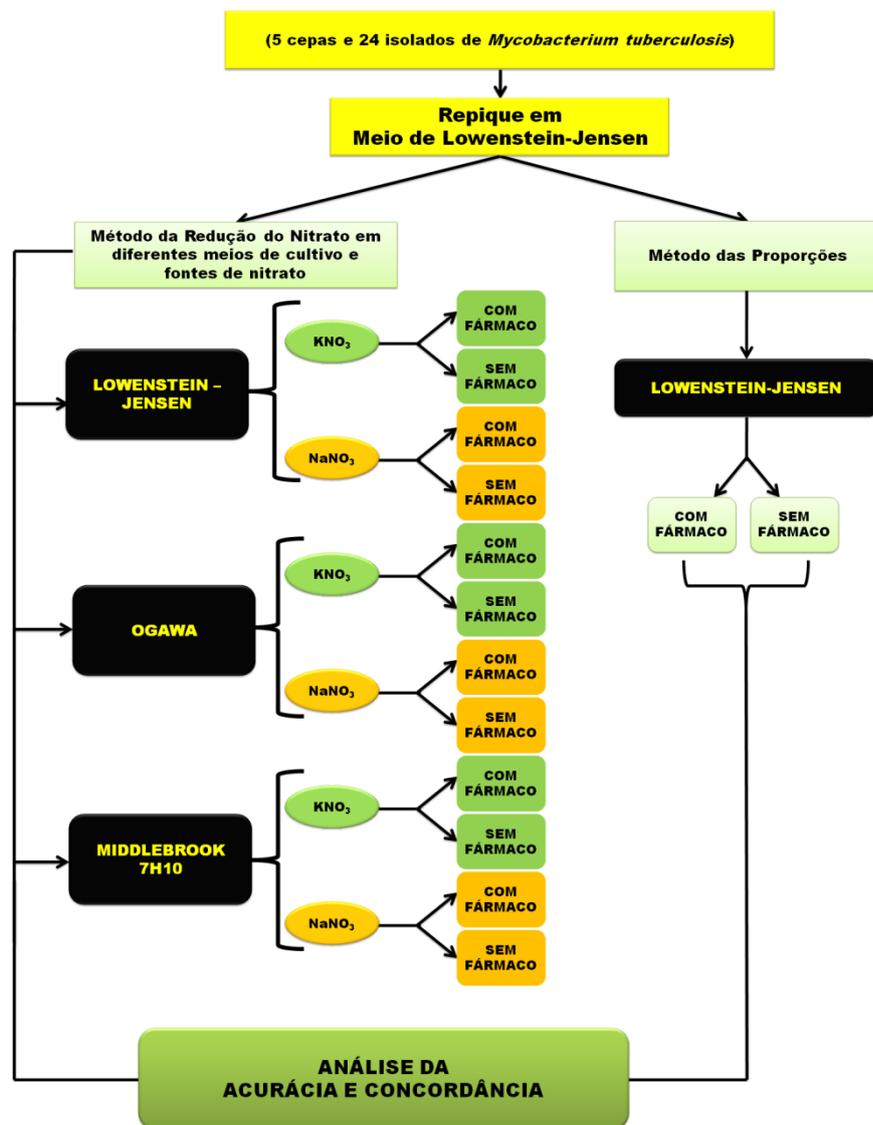
#### 4.2.1 Cepas e Isolados de *M. tuberculosis* analisados.

A pesquisa foi realizada com a cepa padrão de *M. tuberculosis* (H37Rv), sensível a todos os fármacos de uso no combate a Tuberculose e com quatro cepas com padrões de resistência aos fármacos, sendo uma a INH e RIF, uma apenas a RIF, uma ao EMB e INH e uma apenas a STR. Estas cepas foram fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Concomitantemente também foram analisados 24 isolados de *M. tuberculosis*, armazenados em freezer a -70°C durante os anos de 2008 e 2009, na coleção de micobactérias do

Laboratório de Micobacteriologia do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), obtidos de pacientes e com perfis de sensibilidade desconhecidos.

### 4.3 Fluxo de Atividades

A seqüência das etapas do estudo encontra-se ilustrada na Figura 3.



KNO<sub>3</sub>: nitrato de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio

Figura 3. Fluxo das etapas de análise da acuidade do método da redução do nitrato (MRN) modificado comparativamente com a técnica original e o método das proporções (MP).

## 4.4 Detalhamento dos Procedimentos

### 4.4.1 Preparação dos meios de cultivo

O MRN foi realizado em seu meio de cultivo original Lowenstein-Jensen (LJ) e em 2 outros diferentes meios de cultivos: Middlebrook 7H10 e o meio de Ogawa pH 7.0 (OG). Cada meio foi preparado com duas diferentes fontes de nitrato, sendo em uma partida adicionado o nitrato de potássio ( $KNO_3$ ) e na outra o nitrato de sódio ( $NaNO_3$ ). As partidas de meio de cultivo foram divididas em 5 frações iguais, das quais em 4 foram adicionados os fármacos a serem analisados (INH, RIF, EMB e STR) nas concentrações indicadas no Apêndice 1, e uma sem adição de fármaco para controle de desenvolvimento micobacteriano.

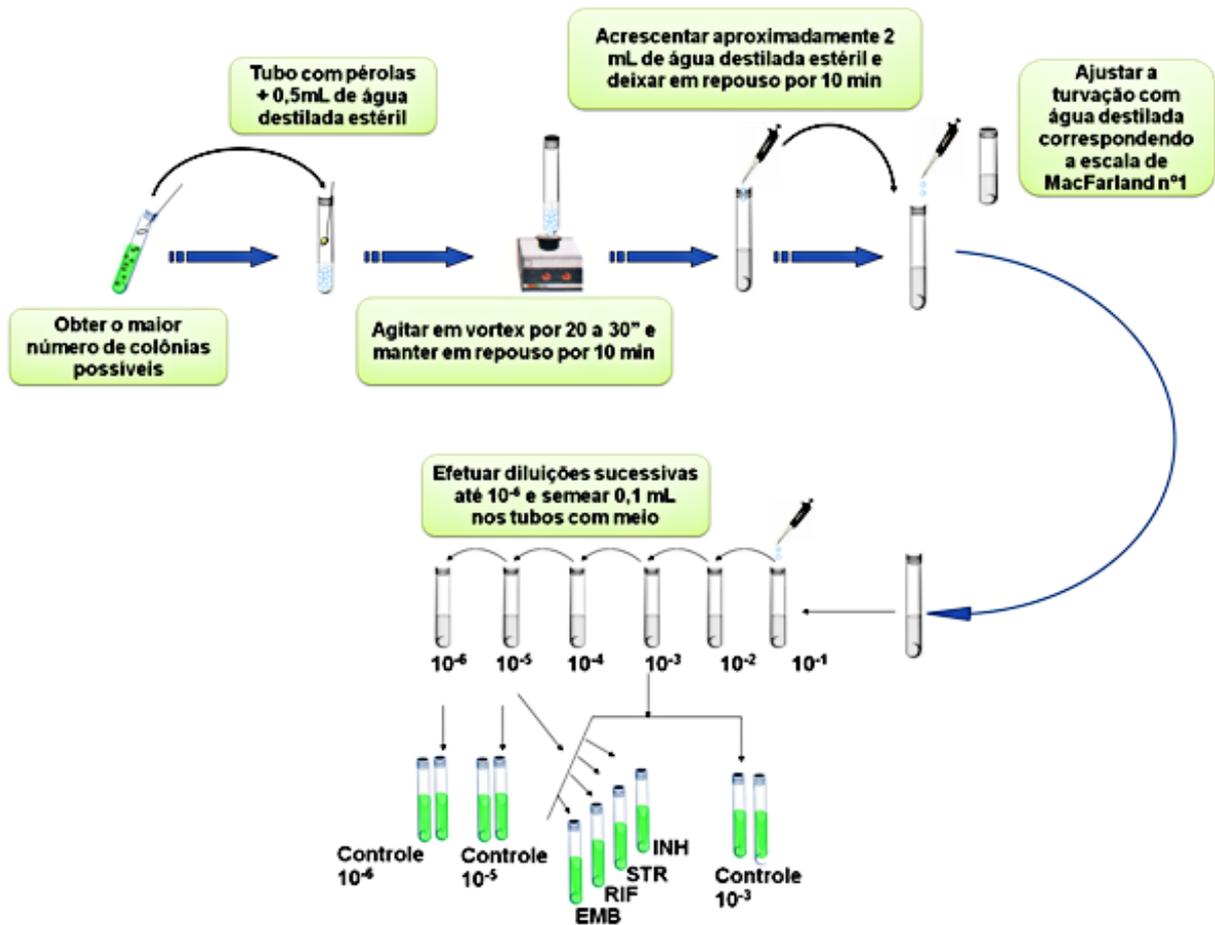
Todas as etapas de preparação dos meios como pesagem, diluição, volume de incorporação dos fármacos, data de preparação, entre outras, foram anotadas em formulário padronizado pelo Ministério da Saúde e apresentados no Anexo 1 (BRASIL, 2008).

### 4.4.2 Ativação das cepas e isolados micobacterianos.

As cepas e isolados de *M. tuberculosis* previstas no estudo foram repicadas em meio de Lowenstein-Jensen (LJ). Para tanto, as colônias existentes na superfície do meio foram retiradas com alça de platina e inseridas em tubo contendo 1 mL de água destilada e pérolas de vidro esterilizadas. Para a desagregação e homogeneização da massa bacilar o tubo foi colocado em vortex por um período de 2 min. Após esse tempo, alíquotas de 0,2 mL da suspensão foram semeadas em três tubos contendo o meio de LJ os quais foram incubados em estufa a 37° C por 21 dias. O referido período de incubação foi necessário para que se obtivessem unidades formadoras de colônia (UFC) em fase exponencial de desenvolvimento.

#### 4.4.3 Realização do Método das Proporções (padrão ouro)

As etapas de preparação do inóculo micobacteriano e a semeadura em tubos contendo meio de cultivo com e sem fármaco foram executadas conforme estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1996) e estão apresentadas na Figura 4.



INH: isoniazida; STR: estreptomicina; RIF: rifampicina; EMB: etambutol

Figura 4. Fluxo de procedimentos para a realização do Método das Proporções.

Fonte: Adaptado do Manual de Bacteriologia da Tuberculose (MS, 2005).

As diluições foram realizadas com suspensões homogêneas, havendo troca das ponteiros toda vez em que houve transferência de uma diluição concentrada para outra mais diluída. Após a semeadura, os tubos foram incubados horizontalmente, para que o inóculo se distribuísse sobre toda a superfície do meio, mantendo-os com a tampa não completamente

rosqueada, por 24 a 48 horas para secagem em estufa a 37°C. Após este período, as tampas foram completamente fechadas e a incubação deu-se no máximo até 42 dias.

#### 4.4.3.1 Leitura e Interpretação do Método das Proporções

Com 28 dias de incubação realizou-se a primeira leitura, na qual foi observada se houve desenvolvimento de colônias suficientes para interpretar os resultados. Caso tal fato não ocorresse, aguardou-se a segunda leitura ao final de 42 dias de incubação, assegurando o desenvolvimento tardio de colônias mutantes resistentes.

Para a análise da sensibilidade, foi feita a quantificação média das colônias desenvolvidas nos 3 tubos de meio LJ sem fármaco (controle). Se o número de colônias na diluição  $10^{-3}$  foi incontável ou se obteve muitas colônias agregadas, contou-se o número de colônias da diluição  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}$ , de maneira que fosse possível obter o número exato de colônias isoladas. Da mesma forma foi quantificado o número de colônias nos tubos contendo cada um dos fármacos. A porcentagem de colônias desenvolvidas na presença de cada fármaco, com relação à média de colônias nos tubos controle, foi calculada como descrito na fórmula abaixo:

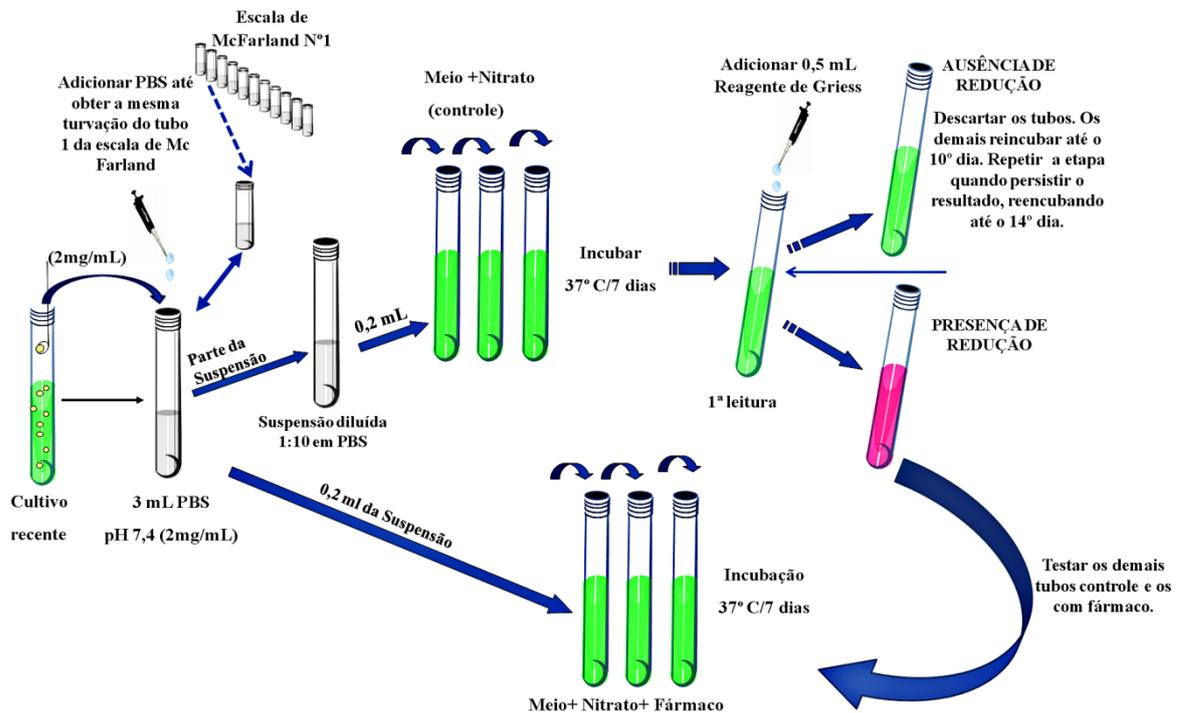
$$\frac{\text{Número de colônias no Tubo com Fármaco}}{\text{Número de Colônias no Tubo Controle}} \times 100 = \% \text{ de Bacilos Resistentes}$$

Quando a porcentagem de desenvolvimento apresentou-se superior a 1% a amostra foi considerada resistente. Os registros foram feitos em formulário descrito no Apêndice 2.

#### 4.4.4 Execução do Método da Redução de Nitrato em meio de Middlebrook 7H10, Lowenstein-Jensen e Ogawa.

Independente da fonte de nitrato utilizada, o MRN foi realizado conforme a técnica original estipulada por Ângeby et al. (2002). As etapas de preparação do inóculo micobacteriano, semeadura nos diferentes meios de cultivo contendo ou não os fármacos a

serem testados, e a etapa de revelação da redução do nitrato a nitrito estão apresentadas na Figura 5.



PBS: solução salina tamponada com fosfato.

Figura 5. Fluxo de atividades para a realização do Método da Redução de Nitrato.

#### 4.4.4.1 Leitura e interpretação do Método da Redução de Nitrato

A mudança de coloração do meio de cultivo de verde para róseo indica que houve redução de nitrato a nitrito, devido ao desenvolvimento do *M. tuberculosis*. Devido o inóculo inicial dos tubos controle ser inferior ao inóculo dos tubos que contêm o fármaco, a leitura para confirmação de resistência se faz comparativamente com a do tubo controle. Assim, foi considerada como cepa resistente ao fármaco testado aquela em que o meio de cultivo apresentou uma coloração mais forte que a do tubo controle testado, ou seja, róseo forte, vermelho intenso ou violeta. Para os tubos que não apresentaram mudança de coloração tem-

se inicialmente o indicativo de sensibilidade ao fármaco testado.

Para a confirmação da sensibilidade ao fármaco testado, após os períodos de incubação apresentados na Figura 5 e ausência de redução, adicionou-se pó de zinco na superfície do cultivo visando verificar se ocorreu redução do nitrito para o óxido nítrico, tendo em vista que o reagente não detecta este composto. Nos casos em que esse tipo de redução não ocorreu, constata-se uma mudança de coloração do meio de verde para róseo, alterando-se também a coloração do reagente de Griess presente no tubo. Confirma-se assim, o não desenvolvimento do *M. tuberculosis* devido o mesmo ser sensível ao fármaco. Os resultados foram registrados em formulário apresentado no Apêndice 3.

#### **4.5 Análise dos Resultados**

Os resultados obtidos com as modificações realizadas no MRN (diferentes fontes de nitrato e meios de cultivo) foram avaliados em relação com os obtidos no Método das Proporções e com os da técnica original do MRN. Para a determinação da co-positividade e co-negatividade foi utilizada a tabela 2 x 2. Nas análises de concordância utilizou-se a concordância observada e o índice Kappa. Para a análise de utilização do método, levou-se em consideração os valores estabelecidos pela rede Supranacional de Laboratórios WHO/IUATLD, que correspondem a concordância observada de 97% para INH, 99% para RIF e 92% para STR e EMB para que um método possa ser utilizado como eficiente na análise de resistência a fármacos (LASZLO et al., 2002). O resultado obtido pelo índice Kappa foi interpretado conforme a escala de valores descrita por Pereira (1995):

- ruim: < 0;
- fraca: 0,01 a 0,2
- sofrível: 0,21 a 0,4
- regular: 0,41 a 0,6
- boa: 0,61 a 0,8
- ótima: 0,81 a 1

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as modificações no método de redução do nitrato (MRN), utilizado para verificação da sensibilidade de cepas de *M. tuberculosis* aos principais fármacos administrados na terapêutica da Tuberculose (Rifampicina, Isoniazida, Etambutol e Estreptomicina), estava previsto o uso do meio de cultivo Middlebrook 7H10 com diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de potássio e nitrato de sódio). Entretanto, a contaminação do meio de cultivo em taxas acima de 10%, em repetidos ensaios, mostrou que o meio não é adequado para utilização em rede básica de saúde localizada em ambientes tropicais. Este meio é recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e é considerado o meio padrão ouro utilizado em muitos países (KENT; KUBICA, 1985). Trabalhos como os de Varma et al. (2002) e Madison et al. (2002), indicam que o método das proporções realizado em meio de Middlebrook 7H10 é bastante eficaz quando comparado ao E-teste ou com o sistema radiométrico Bactec 460.

Com a exclusão do meio de cultivo Middlebrook 7H10, as modificações do MRN ficaram restritas ao uso do meio de Lowenstein-Jensen (LJ) acrescido de nitrato de sódio (LJ- $\text{NaNO}_3$ ) e do meio de Ogawa (OG) acrescido de nitrato de potássio (OG- $\text{KNO}_3$ ) ou nitrato de sódio (OG- $\text{NaNO}_3$ ). Nos Apêndices 3 e 4 estão apresentados os resultados de sensibilidade ou resistência de cada cepa e isolado de *M. tuberculosis*, conforme os fármacos testados.

A análise das concordâncias observadas e acuidade dos resultados entre os métodos executados foi inicialmente efetuada entre o método das proporções (padrão ouro) e o método da redução do nitrato (MRN), original e modificado, para os antibióticos Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH), Etambutol (EMB) e Estreptomicina (STR). Posteriormente, analisou-se o índice Kappa entre os resultados obtidos no MRN original, que utiliza o meio de LJ acrescido de nitrato de potássio (LJ- $\text{KNO}_3$ ), com os resultados obtidos nos MRN modificados. Por

último, foi analisado o tempo de desenvolvimento do *M. tuberculosis* para a execução das leituras dos testes de sensibilidade.

### 5.1 Análise entre o Método das Proporções (MP) e o Método da Redução do Nitrato (MRN), original e modificados.

Os resultados de sensibilidade e resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos RIF, INH, EMB e STR, obtidos na análise entre o Método das Proporções e o MRN original e modificados, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Resultados dos antibiogramas entre o Método das Proporções (MP) e o Método da Redução do nitrato (MRN), original e modificado.

	Meios	Método das Proporções																		
		R	S	T	R	S	T	R	S	T										
MRN – Rifampicina	LJ KNO <sub>3</sub>	R	2	0	29	MRN – Isoniazida	R	3	0	29	MRN – Etambutol	R	1	0	29	MRN – Estreptomicina	R	5	0	29
		S	0	27			S	0	26			S	0	28			S	0	24	
	LJ NaNO <sub>3</sub>	R	2	0	29		R	3	0	29		R	1	0	29		R	5	1	29
		S	0	27			S	0	26			S	0	28			S	0	23	
	OG KNO <sub>3</sub>	R	2	0	29		R	3	0	29		R	1	2	29		R	5	12	29
		S	0	27			S	0	26			S	0	26			S	0	12	
	OG NaNO <sub>3</sub>	R	2	0	29		R	3	0	29		R	1	3	29		R	5	14	29
		S	0	27			S	0	26			S	0	25			S	0	10	

MRN: Método da Redução de nitrato; LJ: Lowenstein-Jensen; OG: Ogawa; KNO<sub>3</sub>: nitrato de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio; R: resistente; S: sensível.

Mediante os resultados apresentados na Tabela 1, a técnica original do MRN (LJ-KNO<sub>3</sub>) teve 100% de concordância observada (acurácia) com o método das proporções (padrão ouro) para os quatro fármacos testados (RIF, INH, EMB e STR). Vale ressaltar que as cepas com padrões de resistência aos fármacos tiveram seus resultados confirmados entre os dois métodos citados.

De acordo com a meta-análise comparativa do MP com o MRN para os fármacos RIF e INH, efetuada por Martin et al. (2008), e realizada no período de 2002 a 2007, a co-

positividade para o fármaco RIF foi igual ou superior a 94% e co-negatividade sempre de 100%. Para INH, o mesmo estudo apresentou co-positividade igual ou superior a 92% e co-negatividade igual ou superior a 97%. Os autores alertam que, apesar de raro, existem isolados de *M. tuberculosis* que não produzem a enzima nitrataze, sendo, portanto, inábeis em reduzir o nitrato. Nestes casos o MRN não é o método correto para análise de sensibilidade aos fármacos, visto que as variações na co-positividade e co-negatividade poderiam ter relação com a ausência de produção da enzima, levando a não obtenção de total concordância do MRN com o método das proporções. No presente estudo foram obtidos resultados de 100% de concordância entre os métodos devido às cepas e isolados testados serem todos produtores da enzima nitrataze, conforme suas identificações fenotípicas.

O alerta de Martin et al. (2008) sobre isolados de *M. tuberculosis* não produtores da enzima nitrataze, faz com que seja obrigatório o uso da reação do nitrato na identificação fenotípica antes que se possa fazer uso do MRN original ou modificado. Assim, serviços onde o teste não faz parte da rotina de identificação não podem fazer uso do MRN na averiguação de sensibilidade aos fármacos.

Em proposta da rede Supranacional de Laboratórios de Referência –WHO/IUATLD (World Health Organization/ International Union Against Tuberculosis and Lung Disease)-, para que um método possa ser utilizado como eficiente na análise de resistência a fármacos deve obter uma concordância observada de 99% para RIF, 97% para INH e 92% para STR e EMB (LASZLO et al., 2002). Assim, estudos vêm sendo executados para verificar a eficiência do MRN em relação a outros métodos que não o MP. Nesse sentido, o trabalho de Ängeby et al. (2002), comparou o MRN com o sistema radiométrico Bactec 460, tendo obtido uma co-positividade e co-negatividade para RIF foi de 100%, enquanto que para a INH foi de 97% e 96%, respectivamente. Assim, os resultados dos diferentes estudos indicam que o MRN é um método bastante eficaz para a pesquisa de resistência aos fármacos, de primeira linha no tratamento da TB, sendo que a RIF está quase sempre relacionada com

multirresistência, se tornando um importante marcador para cepas MDR (VARELDZIS et al., 1994).

Apesar de também se ter obtido 100% de concordância do MP com o MRN original na análise dos fármacos EMB e STR, é importante relatar que no estudo de Martins et al. (2005) sobre a reprodutibilidade do MRN original em 5 laboratórios de referência, a concordância dos resultados variou de 93,3% a 100% na análise da RIF, de 93,3% a 100% para a INH, de 96,6 a 100% para o EMB e de 73,3% a 93,3% para a STR. Com exceção da STR, o estudo confirma a eficácia de utilização do MRN na definição da sensibilidade do *M. tuberculosis* aos fármacos de uso no tratamento primário da Tb (RIF, INH e EMB). Entretanto, considera que o método não deve ser utilizado para estudar a STR, alegando uma possível interação entre o fármaco e o  $\text{KNO}_3$ , o que propiciaria a inativação do fármaco nas dosagens recomendadas para os testes de sensibilidade.

Analisando os resultados entre o MP e a modificação do MRN – manutenção do meio de cultivo LJ e a substituição do  $\text{KNO}_3$  pelo  $\text{NaNO}_3$  (LJ- $\text{NaNO}_3$  – Tabela 1), constatou-se 100% de co-positividade e co-negatividade nas análises dos fármacos RIF, INH e EMB, assim como ótima concordância ( $\text{Kappa}=1$ ) entre os métodos. As cepas com padrões de resistência aos fármacos tiveram seus resultados confirmados entre os dois métodos analisados. Dos 24 isolados clínicos de *M. tuberculosis* apenas um apresentou resistência a INH em ambos os métodos, correspondendo a 4,1% dos isolados analisados. Apesar da amostragem não ter a intenção de estabelecer os índices de resistência, os resultados obtidos são considerados como “altos” pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2009). Vale ressaltar que a análise de substituição do  $\text{KNO}_3$  pelo  $\text{NaNO}_3$  é o principal objetivo do presente trabalho, tendo o mesmo obtido os mesmos resultados da técnica original do MRN em relação ao MP, padrão ouro de análise de sensibilidade aos fármacos.

Com relação à análise da STR, fármaco utilizado apenas nos esquemas de tratamento

de resistência medicamentosa, constatou-se apenas uma discordância do MRN LJ-NaNO<sub>3</sub> em relação ao MP. Tal fato propiciou uma concordância observada de 96%, sendo a co-positividade de 100% e a co-negatividade de 95,8%. Vale ressaltar que mesmo quando os trabalhos são realizados entre o MRN original e o MP, a média dos valores obtidos para co-positividade e co-negatividade é de 83,0% e 96,1%, respectivamente (COBAN et al., 2004; MENGATTO et al.,2006). Assim, mesmo para a STR, a modificação realizada forneceu valores superiores aos obtidos por outros autores que utilizaram o MRN original.

A substituição do meio de LJ pelo meio de OG não forneceu resultados tão promissores quanto aos obtidos na manutenção do meio de LJ acrescido de NaNO<sub>3</sub> (Tabela 1). Constatou-se que quando se utilizou o meio de OG acrescido da fonte padrão de nitrogênio KNO<sub>3</sub>, apenas as análises dos fármacos RIF e INH apresentaram concomitantemente 100% de co-positividade e co-negatividade, assim como ótima concordância (Kappa=1) com o MP.

Na análise do fármaco EMB em meio de OG e com ambas as fontes de nitrato (Tabela 1), obteve-se 100% de co-positividade. Entretanto, a co-negatividade foi de 92,8% para o meio acrescido de KNO<sub>3</sub> e de 89,3% quando se utilizou o NaNO<sub>3</sub>. Esses resultados propiciaram valores de concordância observada de 93% no meio de OG com KNO<sub>3</sub> e de 89,6% no OG-NaNO<sub>3</sub>. Vale ressaltar que o meio de Ogawa é usualmente formulado para um pH ácido de 6,2 ou 6,4. Neste estudo o meio foi ajustado para um pH de 7,0 visando evitar qualquer alteração na atividade do fármaco EMB, pois segundo Tamura et al. (1968, apud TANOUE et al., 2002), o pH ácido pode comprometer a ação do fármaco “in vitro”, assim como a quantidade de proteínas e fosfatos existentes no meio de OG, que é mais elevada em relação ao meio LJ. Mediante o exposto, podemos pressupor que a probabilidade dos resultados discordantes terem sido ocasionados pelo pH, é relativamente baixa.

Com relação ao fármaco STR, constatou-se 41,3% (12/29) e 48,2% (14/29) de resultados falso-resistentes, entre o MP e os experimentos com OG-KNO<sub>3</sub> e OG-NaNO<sub>3</sub>

(Tabela 1), propiciando uma concordância observada foi de 58% e 51,7%, respectivamente. Assim, ficaram muito aquém do valor de 92% sugeridos pela rede Supranacional de Laboratórios de Referência WHO/IUATLD (LASZLO et al., 2002).

Na literatura e em relação apenas ao uso do meio de OG, encontramos o trabalho de Tanoue et al. (2002), realizado com o Método das Proporções em meios de LJ e OG e obtendo também as maiores concordâncias para RIF (100%) e INH (97,7%). Para os fármacos EMB e STR as concordâncias foram inferiores, com valores de 86% e 88,9%, respectivamente. Para contornar o problema, os autores sugeriram um aumento nas concentrações dos fármacos EMB (de 2,0 µg/mL para 2,5 µg/mL) e STR (de 4 µg/mL para 10µg/mL), sendo também recomendado pela Sociedade Japonesa de Tuberculose quando da utilização do MP em meio de Ogawa.

Mediante o exposto, uma das hipóteses para explicar o alto percentual de falso-resistentes para a STR em meio de OG e independente da fonte de nitrogênio, seria que a baixa concentração do fármaco estaria influenciando no resultado. Esta hipótese tem por base a semelhante ocorrência quando se utiliza o MRN original, conforme relatado nos trabalhos de Martins et al. (2005), Musa et al. (2005), WHO (2008) e Ani et al. (2009).

Independente do motivo, os resultados obtidos no presente experimento indicam a inviabilidade de se utilizar o meio de OG para análise de sensibilidade do EMB e da STR pelo MRN, independente da fonte de nitrogênio utilizada.

Diante do exposto, pode-se afirmar que o MRN em meio de LJ acrescido de  $\text{NaNO}_3$  apresentou resultados idênticos aos obtidos no método das proporções (padrão ouro) e no MRN original para os fármacos RIF, INH e EMB, indicando ser uma ótima alternativa para a rede básica de saúde que necessita estabelecer rapidamente o perfil de resistência de isolados de *M. tuberculosis*, obtidos de casos novos de Tb que não estão respondendo adequadamente ao tratamento. No entanto, para o MRN em meio de Ogawa, sugere-se avaliações futuras nas concentrações dos fármacos EMB e STR a fim de encontrar as concentrações adequadas para a avaliação da sensibilidade.

## 5.2 Análise do MRN original com o MRN modificado.

Visto a concordância observada de 100% entre a técnica original do MRN (LJ-KNO<sub>3</sub>) e o método das proporções (padrão ouro), para os quatro fármacos testados (RIF, INH, EMB e STR), realizou-se a análise entre os dados obtidos nos MRN, original (LJ-KNO<sub>3</sub>) e modificado (LJ-NaNO<sub>3</sub>; OG-KNO<sub>3</sub>; OG-NaNO<sub>3</sub>). Os resultados de resistência e sensibilidade estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2

Resultados dos antibiogramas entre o MRN original e os MRN modificados.

MRN – LJ-KNO <sub>3</sub>													
	Meios	Rifampicina			Isoniazida			Etambutol			Estreptomicina		
		R	S	T	R	S	T	R	S	T	R	S	T
MRN – modificado	LJ NaNO <sub>3</sub>	R	2	0	R	3	0	R	1	0	R	5	1
		S	0	27		S	0		26	S		0	28
	OG KNO <sub>3</sub>	R	2	0	R	3	0	R	1	2	R	5	12
		S	0	27		S	0		26	S		0	26
	OG NaNO <sub>3</sub>	R	2	0	R	3	0	R	1	3	R	5	14
		S	0	27		S	0		26	S		0	25

MRN: Método da Redução de nitrato; LJ: Lowenstein-Jensen; OG: Ogawa; KNO<sub>3</sub>: nitrato de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio; R: resistente; S: sensível.

Na análise dos fármacos RIF, INH e EMB, a modificação do MRN pelo uso do meio de LJ acrescido de NaNO<sub>3</sub> propiciou concordância de 100% com o método original. Entretanto e apesar da co-positividade ter sido de 100% para a STR, a co-negatividade (verdadeiramente sensíveis) foi de 95,8%, propiciando uma concordância observada de 96% e um índice Kappa de 0,88. Neste caso a modificação ainda é adequada, pois a concordância observada é superior aos 92% previstos como ideais pela rede Supranacional de Laboratórios de Referência WHO/IUATLD (LASZLO et al., 2002). Apesar disto e visto que a STR não faz parte do esquema atual de tratamento primário da Tb, conclui-se que a utilização do NaNO<sub>3</sub>

em meio de LJ viabiliza a realização do MRN com a mesma eficácia da técnica original. Assim, o mesmo pode ser implantado com segurança pela rede básica de saúde, sem o entrave de obtenção do reagente  $\text{KNO}_3$ .

A análise da modificação do MRN, utilizando o meio de Ogawa e as duas diferentes fontes de nitrogênio, mostra resultados não muito promissores, pois apesar de se ter obtido concordâncias de 100% para os fármacos RIF e INH com ambas as fontes de nitrogênio, o mesmo não aconteceu com o EMB e a STR.

Na utilização do OG- $\text{KNO}_3$  para a análise do fármaco EMB, obteve-se uma concordância observada de 93% e uma co-negatividade de 92,8% com o MRN original, devido dois isolados de *M. tuberculosis* terem apresentado uma falsa-resistência. Na análise com a STR constatou-se 50% (12/24) de resultados falso-resistentes, implicando em uma concordância observada de 58,6% e um fraco índice de Kappa (0,25).

Quando se verificou a sensibilidade ao EMB em meio de OG acrescido de  $\text{NaNO}_3$ , os resultados foram menos satisfatórios, pois constatou-se três resultados de falsa-resistência. A concordância observada entre a modificação e o MRN original foi de 89,6% e o índice Kappa de 0,36. Para a STR, a falsa-resistência foi detectada em 14 isolados de *M. tuberculosis*, propiciando uma concordância observada de 51,7 e um Kappa de 0,19. Neste caso deve se ter em conta que os resultados podem ser devido à baixa concentração do fármaco, conforme anteriormente discutido.

Os resultados obtidos nas análises entre o MRN original e o de uso do meio de Ogawa, com as diferentes fontes de nitrogênio, indicam que as modificações não são adequadas para avaliação de sensibilidade aos fármacos EMB e STR, visto que proporcionaram percentuais inferiores ao mínimo de 92% sugeridos pela WHO/IUATLD (LASZLO et al., 2002). Apesar das modificações terem sido eficazes para a RIF e INH, não se considera que a mesma possa ser utilizada na rede básica por não servir para avaliação do EMB, fármaco que faz parte do tratamento primário da Tb. Entretanto, indica-se a realização de novos estudos para avaliar o

desempenho dos fármacos EMB e STR em meio de OG, para ambas as fontes de nitrato.

Resumidamente conclui-se que das modificações analisadas e resultados encontrados, o uso do meio LJ é o mais adequado na realização do MRN. Entretanto, e em localidades onde a fonte de nitrogênio  $\text{KNO}_3$  for de difícil aquisição, pode-se utilizar o  $\text{NaNO}_3$  devido ter sido encontrada uma co-positividade, co-negatividade e concordância de 100% com o MP e com o MRN original, para os fármacos RIF, INH e EMB, e uma concordância de 96% com o MP e MRN original para o fármaco STR, concordância essa em níveis superiores aos sugeridos pela rede Supranacional de Laboratórios de Referência -WHO/IUATLD. Vale ressaltar que a RIF, INH e EMB correspondem a 3 dos 4 fármacos atualmente utilizados na politerapêutica dos casos novos de Tb.

### 5.3 Análises do tempo de leitura do MRN, original e modificado

Os resultados referentes ao tempo de leitura do MRN nos diferentes meios de cultivo e fontes de nitrogênio utilizados no experimento estão apresentados na Figura 6.

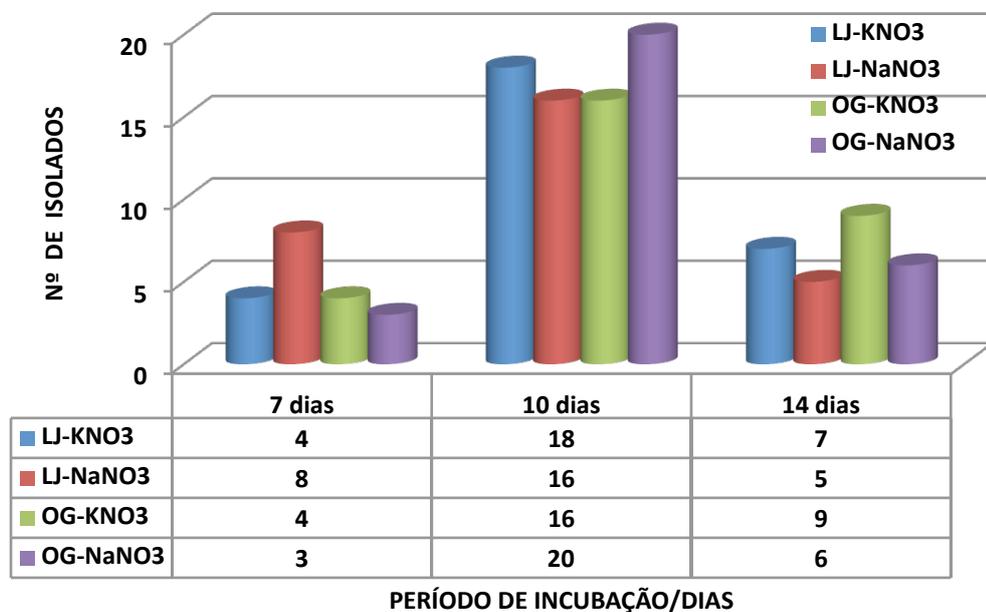


Figura 6. Distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* conforme o tempo de leitura no MRN, original e modificado.

Quando se comparou os meios, independente da fonte de nitrato, observou-se que o meio LJ revelou maior número de isolados em relação ao OG, tanto no 7º dia (LJ=4+8 e OG=4+3) quanto ao total acumulado até o 10 dia (LJ=46/58 →79,3%; OG= 43/58 → 74,1%) de leitura.

Com relação ao MRN em meio de LJ, a substituição da fonte de nitrato proporcionou um acréscimo de 50% no número de leituras definitivas ao 7º dia de incubação, sendo que com até 10 dias o percentual de isolados com leitura definitiva foi de 82,7% frente a 75,8% obtidos no MRN original.

Quando o MRN foi analisado em meio de OG, o número de isolados em ambas as fontes de nitrato foi semelhante no 7º dia de incubação. Entretanto, no 10º dia o total de isolados obtidos quando se utilizou  $\text{NaNO}_3$  foi de 79,3%, enquanto o  $\text{KNO}_3$  foi de 68,9%.

Mediante o exposto, os resultados sugerem que o MRN em meio de LJ- $\text{NaNO}_3$  pode ser um método alternativo para laboratórios da rede básica de saúde que necessitam diagnosticar cepas de *M. tuberculosis* resistentes, visto apresentar maior rapidez na obtenção dos resultados da leitura dos testes de sensibilidade.

## 6. CONCLUSÕES

- 6.1 A excelente reprodutibilidade e concordância do Método da Redução do Nitrato (MRN) original com o Método das Proporções (padrão ouro), para os fármacos Rifampicina, Isoniazida, Etambutol e Estreptomicina, confirmam que o MRN original é uma metodologia alternativa na detecção de isolados de *M. tuberculosis* resistente aos principais fármacos utilizados na terapêutica da Tuberculose;
- 6.2 O resultado de total concordância do Método da Redução do Nitrato modificado pela substituição do nitrato de potássio pelo nitrato de sódio com o Método das Proporções e o Método da Redução do Nitrato original, para os fármacos Rifampicina, Isoniazida e Etambutol, indica que a modificação é uma ótima alternativa para a rede básica de saúde, visto que a fonte de nitrogênio é de fácil aquisição pelos serviços de saúde. Além disso, a constatação de um maior número de isolados com tempo de leitura em 7 dias induz a premissa de maior rapidez na determinação do perfil de resistência em isolados de *M. tuberculosis*;
- 6.3 Os resultados da análise do fármaco Estreptomicina, executada em todas as modificações do Método da Redução do Nitrato, indicam a necessidade de avaliações futuras para estabelecer a concentração adequada à avaliação da sensibilidade, principalmente no meio de Ogawa.
- 6.4 Os resultados referentes ao MRN realizado em meio de Middlebrook 7H10, indica que este meio não é adequado para utilização em rede básica de saúde devido à ocorrência de contaminação por outros microrganismos, freqüentes em áreas tropicais como a região amazônica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G.; MSHANA, R.N.; MIÖRNER, H.. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.2, n.12, p. 1011–1016, 1998.

A.L.A. AMERICAN LUNG ASSOCIATION. 2008. Disponível em: <<http://www.lungusa.org>> . Acesso: 20 nov. 2008.

ÄNGEBY, K. A. K.; LISBETH K.; HOFFNER, S. E. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, n. 2, p. 553–555, 2002.

ANI, A. E.; DALYOP, Y. B.; AGBAJI, O.; IDOKO, J. Drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* by nitrate reductase assay. **Journal Infection Developing Countries**, v.3, n.1, p.16-19, 2009.

BAYLAN, O.; KISA, O.; ALBAY, A.; DOGANCY, L. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.8, n.6, p.772-777, 2004.

BRASIL. Decreto n.3.665 de 20 de novembro de 2000. Dá nova redação ao Regulamento para a Fiscalização de Produtos Controlados (R-105). In: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 de novembro.2000. Disponível em: <<http://www2.camara.gov.br>>. Acesso: 20 nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual Técnico para o controle da Tuberculose**. Brasília, 2002. Disponível: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_controle\\_tuberculose](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_tuberculose)>. Acesso: 30 jul. 2008

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. 1 ed., série A, 436p, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Tuberculose: Resistência da bactéria no país é de apenas 1,4%. Disponível em: <[http://www.sbinfecto.org.br/default.asp?site\\_Acao=MostraPagina&paginaId=134&mNoti\\_Acao=mostraNoticia&noticiaId=4888](http://www.sbinfecto.org.br/default.asp?site_Acao=MostraPagina&paginaId=134&mNoti_Acao=mostraNoticia&noticiaId=4888)>. Acesso em: 10 jan. 2010.

CENTER FOR DISEASE CONTROL-CDC/MMWR. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* With Extensive Resistance to Second-Line Drugs—Worldwide, 2000-2004, v.55, cn.11, p.301-305, 2006.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H.T.; MENON, N.K.; MITCHISON, D.A.; RIST, N.; SMELEV, N. A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. **Bulletin of the World Health Organization**, n.41, p.21-43, 1969.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H.T.; MENON, N.K.; MITCHISON, D.A.; RIST,N.; SMELEV, N. A.. Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, n.29, p.565-578, 1963.

CAVIEDS, L.; LEE, T. S.; GILMAN, R. H.; SHEEN, P.; SPELMAN, E.; LEE, E.H.; BERG, D.E.; MONTENEGRO-JAMES, S. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3, p.1203–1208, 2000.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**. 1. ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu 2003.

COBAN, A. Y.; BIRINCI, A.; EKINCI, B.; DURUPINAR, B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p.106–108, 2004.

COHEN, T.; COLIJN, C.; FLINKLEA, B.; WRIGHT, A.; ZIGNOL, M.; PYM, A.; MURRAY, M. Are survey-based estimates of the burden of drug resistant tb too low? Insight from a simulation study. **Plos One**, v. 3, n.6, p.2363, 2008

COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, n.21, p. 299-308, 2003.

CHAUCA, J. A.; PALOMINO, J. C.; GUERRA, H. Evaluation of rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage D29-based assay. **Journal of Medical Microbiology**, n.56, p.360–364, 2007.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K. N.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.1, p. 34-42, 2007.

DAVID,H.C. Diagnostic and public health mycobacteriologia. **European Society of Mycobacteriologists by an ad hoc Committee**, p.2-102, 1984.

ESPINAL, M. A. The global situation of MDR-TB. **Tuberculosis**. v.83, p.44-51, 2003.

GANGADHARAM, P.R.J. Drug resistance in tubercle bacilli. In: GANGADHARAM, P. R. J.; JENKINS, P. A. **Mycobacteria I Basic Aspect**. 2 ed. United States of America: Chapman & Hall, Library of Congress, 1998.

GILLESPIE, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and molecular perspective. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.6, n.2, p.267-274, 2002.

HAZBÓN, M. H.; OROZCO, M. S; LABRADA, L. A.; TOVAR, R.; WEIGLE, K. A.; WANGER, A. Evaluation of Etest for Susceptibility Testing of Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, p.4599-4603, 2000.

HEDGECOCK, L.W.; COSTELLO, R.L. Utilization of nitrate by pathogenic and saprophytic mycobacteria. **Journal of Bacteriology**. n.84, p. 195-205, 1962.

HEIFETS, L. B.; CANGELOSI, G. A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.37, n.7, p. 564-581, 1999.

HONORÉ, N.; COLE, S. Streptomycin resistance in *Mycobacteria*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 38, n.2, p.238-242, 1994.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.3, p.1418-1423, 1990.

KENT, P.T.; KUBICA, G.P.. Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta. **Department of Health and Human Services**, p. 96-103, 1985

KUMAR, M.; KHAN, I. A.; VERMA, V.; KALYAN, N.; QAZIA, G. N. Rapid, inexpensive MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using microplate nitrate reductase assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p.121–124, 2005a.

KUMAR, M.; KHAN, I. A.; VERMA, V.; KALYAN, N.; QAZIA, G. N. Microplate nitrate assay versus Alamar Blue assay for MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n.8, p.939-941, 2005b.

LASZLO, A.; RAHMAN, M.; ESPINAL, M.; RAVIGLIONE, M.; WHO/IUATLD NETWORK OF SUPRANATIONAL REFERENCE LABORATORIES. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994–1998. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.6, n.9, p.748-756, 2002.

LEE, A. G.; TEO, A. S. M.; WONG, S. Y. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n.7, p.2157-2159, 2001.

LEMUS, D.; MARTIN, A.; MONTORO, E.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.130–133, 2004.

LUNA, J. A. C.. Resistência primária a fármacos antituberculosos. **Medicina Clínica**, v. 93, n.1, p. 30-36, 1989.

LUNA, J. A. C..Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. **Archivos de Bronconeumología**, v. 37, n.1, p.35-42, 2001.

MADISON, B; DUNN, B. R.; GEORGE, I.; GROSS, W.; LIPMAN, H.; METCHOCK, B.; SLOUTSKY, A.; WASHABAUGH, G.; MAZUREK, G.; RIDDERHOF, J. Multicenter Evaluation of Ethambutol Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Agar Proportion and Radiometric Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.11, p.3976-3979, 2002.

MARTIN, A.; Camacho, M.; Portaels, F.; Palomino, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-Line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.11, p.3616–3619, 2003.

MARTIN, A.; MONTORO, E.; DIHADENYS, L.; SIMBOLI, N.; MORCILLO, N.; CHAUCA, J.; RITACCO, F. P.; PALOMINO, J. C. Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, n.63, p.145-150, 2005.

MARTIN, A.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.59, p.175–183, 2007.

MARTIN, A.; PANAIOTOV, S.; PORTAELS, F.; HOFFNER, S.; PALOMINO, J. C.; ANEGY, K. The Nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p.1-9, 2008.

MEIER, A., SANDER, P., SCHAPER, K.J., SCHOLZ, M., BOTTGER, E.C. Correlation of Molecular Resistance Mechanisms and Phenotypic Resistance Levels in Streptomycin-Resistant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy and Chemotherapy**, v.40, n.11, p.2452-2454, 1996.

MENGATTO, L.; CHIARI, Y.; IMAZ, M. S. Evaluation of rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.535-542, 2006.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. Bacteriology of Tuberculosis: Laboratory Methods. Tuberculosis Treatment, v. 48, n.7, p.844-853, 1958.

MITCHISON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.2, n.1, p.10-15, 1998.

MITCHISON, D. A. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 699-706, 2005.

MONTORO, E.; LEMUS, D.; ECHEMENDIA, M.; MARTIN, A., PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. 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*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.55, p.500–505, 2005.

MUSA, H. R.; AMBROGGI M.; SOUTO, A.; ÄNGEBY, K. A.K. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy-positive sputum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.7, p.3159–3161, 2005.

OTU, J.; ANTONIO, M.; CHEUNG, Y. B.; DONKOR, S.; BOUKE, C. J.; CORRAH, T.; ADEGBOLA, R. A. A. Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 with BACTEC 9000

MB and L-J for isolation of mycobacteria in The Gambia. **Journal Infect Developing Countries**, v.2, n.3, p.200-205, 2008.

PAI, M.; KALANTRIA, S.; PASCOPELLAD, L; RILEYA, L. W.; REINGOLD, A. L. Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. **Journal of Infection**, n.51, p.175–187, 2005.

PALOMINO, J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, v.26, n.9, p.339-350, 2005.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; GROLL, A. V.; PORTAELS, F.. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, 2008.

PANAIOTOV, S.; KANTARDJIEV, T. Nitrate reductase assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, p.3881–3882, 2002.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**, 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.596.

PFYFFER, G. E. Drug-resistant tuberculosis: resistance mechanisms and rapid susceptibility testing. **Schweiz Medical Wochenschr**, n.130, p.1909-1913, 2000.

RAMAKRISHNAN, T.; MURTHY, P. S.; GOPINATHAN K. P.. Intermediary metabolism of mycobacteria. **Bacteriological Reviews**, v.36, n.1, p.65-108, 1972.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N..Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.195-208,1998.

REIS, R. S.; NEVES, I.; LOURENCO, S.L.S; FONSECA, L.S.; LOURENC, M.C.; Comparison of flow cytometric and Alamar blue tests with the proportional method for testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.2247–2248, 2004.

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

ROSSETTI, M. L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças Infecciosas – Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

RUIZ, P.; ZEROLO, F. J.; CASAL, M. J. Comparison of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the ESP culture system II with that using the BACTEC method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, p. 4663–4664, 2000.

SALEM, J. I. ; GOH, K. S.; LITAIFFI, L. R. L.; CARDOSO, M. S. L.; BRIGLIA, M. F. S. An investigation of primary and acquired drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazon, Brazil). **Jornal de Pneumologia**. v.16, p.6-8, 1990.

SANCHOTENE, K. O.; GROLL, A. V.; RAMOS, D.; SCHOLANTE, A. B.; HONSHA, G., VALENÇA, M.; SCAINI, C. J.; SILVA, P. E. A. 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. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.16-20, 2008.

SATO, D.N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase**. Araraquara:UNESP, 2007. Doutorado Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2007.

SBPT/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso brasileiro de tuberculose: Diretrizes brasileiras para tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.30, supl.1,c.3, p.S24-S37, 2004.

SBPT/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.35, supl.10 p.1018-1048, 2009.

SCHLOSSBERG, D.. **Tuberculosis & Nontuberculous Mycobacterial Infections**. 5ed. United States of America: Mc-Graw-Hill, 2005.

SETHI, S.; SHARMA S.; SHARMA S.K.; MEHARWAL S.K.; JINDAL, S.K.; SHARMA M. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to primary antitubercular drugs by nitrate reductase assay. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, p.468-471, 2004.

SHIFERAW, G.; WOLDEAMANUEL, Y.; GEBEYEHU, M.; Girmachew, F.; DEMESSIE, D.; LEMMA, E. Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay for Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Clinical Microbiol**, v. 45, N. 4, P.1093-1097, 2007.

SHIKAMA, M. L.; SILVA, R. R. F. E.; MARTINS, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, R. F. A M.; SILVA, P. F. E.; TELLES, M. A. S.; MARTIN, A.; PALOMINO, J. C.. Rapid detection of resistant tuberculosis by nitrate reductase assay performed in three settings in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p.794–796, 2009.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Respiratory Research**, v. 2, n.3, p.164-168, 2001.

SHAH, N.S.; WRIGHT, A.; BARRERA, L.; BOULAHBAL, F.; MARTIN-CASABONA, N.; DROBNIIEWSKI, F.; GILPIN, C.; HAVELKOVA, M.; LEPE, R.; LUMP, R.; METCHOCK, B.; PORTAELS, F.; RODRIGUES, M.F.; RUSCH-GERDES, S.; DEUN, A.V.; VICENT, V.; LASERSON, K.; WELLS, C.; CEGIELSKI, J.P. Worlwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.3, p.380-387, 2007.

SREEVATSAN, S.; STOCKBAUER, K. E.; PAN, X.; KREISWIRTH, B. N.; MOGHAZEH, S. L.; JACOBS, W. R.; TELENTI, A.; MUSSER, J. Ethambutol Resistance in

*Mycobacterium tuberculosis*: critical role of EMB<sup>B</sup> Mutation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n.8, p.1677-1681, 1997.

SYRE, H.; PHYU, S.; SANDVEN P.; BJORVATN B.; GREWAL, H. M. S. Rapid Colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.11, p.5173-5177, 2003.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v.3, p.276-284, 2003.

TANOUE, S.; MITARAI, S.; SHISHIDO, H. Comparative study on the use of solid media: Lowenstein-Jensen and Ogawa in the determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. **Elsevier Science Ltd**, v. 82, n. 2/3, p.63-67, 2002.

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J. O. Inhibition of Synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 33, n.9, p. 1493-1499, 1989.

VARELDZIS, B.; GROSSET, P. J.; KANTOR, I.; CROFTON, J.; LASZLO, A.; FELTEN, M.; RAVIGLIONE, M.; KOCHI, A. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. **Tubercle and Lung Disease**, v.75, n.1, p.1-7, 1994.

VARMA, M.; KUMAR, S.; BOSE, M. Comparison of Etest and agar proportion method of testing drug susceptibility of *M. tuberculosis*. **Indian Journal of tuberculosis**, v.490, p.217, 2002.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R.. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

VILCHEZE, C.; JACOBS, W. R. The mechanism of isoniazid killing: Clarity Through the Scope of Genetics. Annual. **Annual Review Microbiology**, v. 61, p.35-50, 2007.

WADE, M. M.; ZANG, Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Bioscience**, v.9, p.975-994, 2004.

WOODS, G. L.; FISH, G.; PLAUNT, M.; MURPHY, T. Clinical evaluation of Difco ESP culture system II for growth and detection of Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.1, p.121-124, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Second edition**. Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control, p.1-23, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Interim recommendations for the surveillance of drug resistance in tuberculosis, 2007. Disponível: <[http://www.who.int/tb/publications/2007/who\\_htm\\_tb\\_2007\\_385.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2007/who_htm_tb_2007_385.pdf)>. Acesso em: 17 Mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Anti-tuberculosis drug resistance in the world**. Fourth Global Report, Geneva, p.394, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: a short update the 2009 report, Geneva, 2009.



## APÊNDICE 2 – Reagentes e Meios de cultivo.

### 1. Reagentes:

#### 1.1. Preparação do meio Lowenstein–Jensen (L-J) modificado para teste de sensibilidade.

##### Materiais utilizados

Fosfato monopotássico	1,2g
Sulfato de magnésio	0,12g
L-asparagina	1,8g
Citrato de magnésio	0,30g
Água destilada	300mL
Glicerina	6mL

Dissolver todos os componentes em 600 mL de água destilada e autoclavar à 121°C durante 15 minutos. Misturar a esta solução 1 litro de homogeneizado de ovo e 20 mL de verde malaquita à 2%. Distribuir o meio em tubos e coagular a temperatura de 80-85°C por 45 minutos.

#### 1.2 Preparação do meio Ogawa

##### Reagentes;

- Fosfato de potássio dihidrogenado (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 3,0g
- Glutamato de sódio 3,0g
- Água destilada 300 mL

Dissolver todos os componentes em 300 mL de água destilada e autoclavar à 121°C durante 30 minutos. Misturar a esta solução 600 mL de homogeneizado de ovo e 18 mL de verde malaquita à 2%. Distribuir o meio em tubos e coagular a temperatura de 80-85°C por 45 minutos. Ajustar o pH do meio para 7,0. O meio será distribuído em tubos de vidro com tampa levemente rosqueadas e depositados no coagulador. A temperatura do coagulador será de 85°C e o tempo de coagulação de **45 minutos**. Após a coagulação os tubos com o meio serão deixados à temperatura ambiente para que esfrie naturalmente ajustando-se as tampas de rosca. Após o esfriamento, os tubos serão guardados sob refrigeração para evitar sua dessecação por várias semanas.

### 1.2.1 Processamento dos fármacos para incorporação em meio de cultivo L-J e Ogawa: INH, STR, EMB e RIF.

As concentrações de cada fármaco, a quantidade a ser incorporada ao meio de cultura e a concentração final estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2

Diluições dos fármacos para incorporação no meio de Lowenstein-Jensen e Ogawa.

Fármacos (10.000µg/mL)	Diluyente (10 mL)	Diluições	Conc. na última diluição	Quantidade adicionada 200ml de meio	Concent. (µg/mL)
INH	água destilada	duas de 1/10	100	0,4	0,2
RIF	metanol	-----	10.000	0,8	40,0
STR	água destilada	uma de 1/10	1.000	0,8	4,0
EMB	água destilada	uma de 1/10	1.000	0,4	2,0

Fonte: Brasil (2008).

Os fármacos serão incorporados nos meios e o procedimento é semelhante ao preparo do meio sem fármaco. Após o esfriamento os tubos serão guardados sob refrigeração para evitar sua dessecação por no máximo **dois meses**.

Preparação das soluções estoque:

As soluções estoque serão preparadas empregando o solvente água destilada estéril. Para os fármacos não solúveis em água se empregará o solvente recomendado.

Os fármacos serão pesados em frascos estéreis, considerando a potência de cada uma, em seguida a solução estoque será aliquotada em criotubos com 1 mL e conservadas a -20°C por no máximo **4 meses**.

### 1.3 Preparação do Reagente de Griess para revelação do MRN.

Reagentes:

1. Ácido clorídrico concentrado 50%
2. Sulfanilamida 0,2%
3. n-1- naftiletilenodiamina 0,1%

**Reativo n°1:** Adicionar cuidadosamente 1 volume de HCl concentrado em 1 volume de água destilada . **ADICIONAR O ÁCIDO SOBRE A ÁGUA.**

**REATIVO N°2:** Dissolver 0,2g de sulfanilamida em 100 mL de água destilada.

**REATIVO N°3:** Dissolver 0,1g de n-1-naftiletilenodiamina em 100 mL de água destilada.

Guardar em refrigerador o substrato e os reativos em frasco escuro.

Desprezar os reativos se houver mudança de cor ou formação de precipitado e armazenar por 2 meses sob refrigeração.

Obs: Misturar os três reagentes no mesmo dia que for inocular nos tubos:

1. **Ácido clorídrico concentrado 50%**----- **1 volume**
2. **Sulfanilamida 0,2%** ----- **2 volumes**
3. **n-1- naftiletilenodiamina 0,1%** ----- **2 volumes**

**APÊNDICE 3** – Resultados das análises do MRN realizados com os fármacos Rifampicina e Isoniazida.

Ord.	Cepas e isolados	MRN-RIFAMPICINA					MRN-ISONIAZIDA				
		L-J		OG		MP	L-J		OG		MP
		KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>		KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	
1	H37RvIA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	27594	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	27420	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
4	27661	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
5	27498	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	98/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	83/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	50/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	123/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	135/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	125/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	77/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	110/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	177/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	022/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	116/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	137/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	170/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	153/08	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
20	172/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	182/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	090/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	150/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	010/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	134/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	147/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	89/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	116/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	121/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Ord: ordem; L-J: Lowenstein-Jensen; OG: Ogawa; KNO<sub>3</sub>: nitrato de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio; MP:método das proporções; S: sensível; R: resistente.

1. Cepa padrão H37Rv - Sensível a todos os fármacos
2. Isolado - Resistente a Rifampicina e Isoniazida
3. Isolado - Resistente a Rifampicina
4. Isolado - Resistente a Etambutol e Isoniazida
5. Isolado - Resistente a Estreptomicina

**APÊNDICE 4** – Resultados das análises do MRN realizados com os fármacos Etambutol e Estreptomicina.

Ord	Isolados	MRN-ETAMBUTOL					MRN-ESTREPTOMICINA				
		L-J		OG		MP	L-J		OG		MP
		KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>		KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	
1	H37Rv1A	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2	27594	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
3	27420	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S
4	27661	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
5	27498	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
6	98/09	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
7	83/09	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
8	50/09	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
9	123/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	135/09	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
11	125/09	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
12	77/09	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
13	110/09	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
14	177/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	022/09	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
16	116/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	137/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	170/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	153/08	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
20	172/08	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
21	182/08	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
22	090/08	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S
23	150/08	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S
24	010/09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	134/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	147/08	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
27	89/08	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
28	116/08	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
29	121/09	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

Ord: ordem; L-J: Lowenstein-Jensen; OG: Ogawa; KNO<sub>3</sub>: nitrato de potássio; NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio; MP: método das proporções; S: sensível; R: resistente.

1. Cepa padrão H37Rv - Sensível a todos os fármacos
2. Isolado - Resistente a Rifampicina e Isoniazida
3. Isolado - Resistente a Rifampicina
4. Isolado - Resistente a Etambutol e Isoniazida
5. Isolado - Resistente a Estreptomicina

Isolados discordantes com o MP

## ANEXO 1 – Formulário de produção de meio com fármacos para métodos de sensibilidade.



Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde

**Formulário - Produção de Meios LJ com  
Drogas para Teste de Sensibilidade**

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Meio LJ com INH, RMP, EMB, SM, TCH e PNB		Nº Lote Produzido
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume
Fosfato Monopotássico					
Sulfato de Magnésio					
Citrato de Magnésio					
Glutamato de Sódio					
Asparagina					
Glicerol					
Verde Malaquita					
Ovos					
ou Meio Base LJ Comercial					
Água destilada					
Esterilização Autoclave - Solução Meio Base					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle	Responsável
				<input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	
Observações:					
Incorporação das drogas e distribuição nos tubos identificados por droga Controlado em formulário separado para cada droga					
Coagulação - Meio Completo + Droga					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle	Responsável
				<input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	
Observações:					
Aspectos Macroscópicos					
Cor	Consistência	Volume	Inclinação	Textura	Responsável
<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> R	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> R	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> R	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> R	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> R	
Observações:				Data:	
A = Aprovado = conforme esperado			R = Reprovado = em desacordo com o esperado		
Controle de Esterilidade - Incubação a 36 ± 1°C até 48 horas					
Data:			Estufa:		
<input type="checkbox"/> Aprovado = Não Houve Crescimento de Microrganismos			<input type="checkbox"/> Reprovado = Houve Crescimento de Microrganismos		
Observações:				Responsável:	