

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Reginalda Ferreira de Melo Medeiros

Diagnóstico Rápido de Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a Rifampicina e Isoniazida pelo Método de Nitrato Redutase

Rio de Janeiro

2016

Reginalda Ferreira de Melo Medeiros

Diagnóstico rápido de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina e isoniazida pelo método de nitrato redutase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Epidemiologia em Saúde Pública. Área de concentração: Epidemiologia aplicada aos serviços de saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes.

Coorientador: Prof. Dr. Luis Caetano Martha Antunes.

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

M488d Medeiros, Reginalda Ferreira de Melo
Diagnóstico rápido de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina e isoniazida pelo método de nitrato redutase. / Reginalda Ferreira de Melo Medeiros. -- Rio de Janeiro: s.n., 2016.

64 f., il., tab.

Orientadores: Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes.
Luis Caetano Martha Antunes.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1.Tuberculose Pulmonar /quimioterapia. 2.Tuberculose Resistente a Múltiplos Medicamentos/diagnóstico. 3.*Mycobacterium tuberculosis* /isolamento & purificação. 4.Testes de Sensibilidade Microbiana/métodos. 5.Nitrato Redutase. 6.Antituberculosos. I.Título. CDD – 22.ed. – 616.995

Reginalda Ferreira de Melo Medeiros

Diagnóstico rápido de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina e isoniazida pelo método de nitrato redutase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Epidemiologia em Saúde Pública. Área de concentração: Epidemiologia aplicada aos serviços de saúde.

Aprovada em: 25 de novembro de 2016.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Silvana Spindola de Miranda
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Paulo Redner
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - Centro de
Referência Professor Hélio Fraga

Prof.^a Dra. Fátima Fandinho (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - Centro de
Referência Professor Hélio Fraga

Rio de Janeiro

2016

Para minha irmã Graça, por tudo o que sou e por tudo que tenho.
Para meu esposo Fernando e meu filho Luiz Fernando, minhas fontes de inspiração.
Para Isabela, o amor em pessoa.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de todas as coisas.

Aos meus pais, Elpídio e Raimunda, *in memoriam*, meus exemplos, pelos valores família-amor deixados como a maior e melhor herança.

Ao meu cunhado Marques, meu eterno agradecimento pelo apoio aos meus estudos.

À toda minha família, as minhas irmãs e irmão pelo incentivo, carinho e compreensão.

À Dra. Angela Werneck, *in memoriam*, por toda confiança depositada em mim como profissional.

À Dra. Maria Alice Telles pela orientação e escolha do título dessa dissertação.

À Dra. Fátima Fandinho, Coordenadora do laboratório do CRPHF/ENSP/FIOCRUZ, pela confiança, apoio, parceria e incentivo à Pesquisa.

Um agradecimento especial às colegas Juanaína Mariano, Bianca Porphirio e Thatiana Alfena, vocês me ajudaram muito neste trabalho.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose do CRPHF.

Aos Professores e Professoras do Mestrado Profissional em Epidemiologia e Controle da Tuberculose/ENSP/FIOCRUZ/RJ – AGEU/PE, que, com entusiasmo e competência, nos permitiram conhecer o mundo infinito e interessante da Epidemiologia da Tuberculose.

À Coordenação do Mestrado Profissional em Epidemiologia e Controle da Tuberculose da ENSP/FIOCRUZ, pelo apoio.

Aos Coordenadores Dr. Jesus Ramos e Dr. Paulo Basta, pela disposição, interesse e comprometimento durante esses dois anos de Mestrado.

Aos meus colegas de turma do Rio de Janeiro e de Recife. Meus companheiros, meus amigos, meus parceiros. Dividimos tantas coisas, mas o que vai ficar para sempre é o nosso aprendizado, nossa cumplicidade, a felicidade que nos abraçou nesse tempo de convivência ímpar!

Às minhas colegas de turma Magna e Sandra, pela parceria e estudos em grupo.

Ao meu sobrinho Arthur, por toda a parte de informática relacionada à dissertação. Obrigada pela paciência.

Ao Luan Moraes Azevêdo, Mestre em Educação Física da Universidade Federal de Sergipe pela orientação na parte de Bioestatística.

Ao meu grande Mestre, Prof. Dr. Paulo Redner, pela orientação na parte de cálculos. Obrigada pela disponibilidade.

Aos meus orientadores, Dra. Fatima e Dr. Caetano obrigada, vocês são pessoas muito especiais para mim.

A vida é a hesitação entre uma exclamação e uma interrogação. Na dúvida, há um ponto final.

PESSOA, 1984, p. 279.

RESUMO

A tuberculose (TB) permanece entre as doenças infecciosas que mais acometem a humanidade, sendo considerada como problema de saúde pública de relevância mundial. Nosso estudo consiste em diagnosticar com rapidez cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina e isoniazida por meio de nitrato redutase (NRA), o que seria de grande importância para o início do tratamento, contribuindo para a quebra da cadeia de transmissão dos casos de tuberculose multirresistentes (TB-MDR). Para este estudo foi utilizada 140 cepas de *M. tuberculosis*, pertencentes ao acervo do CRPHF, para avaliar a sensibilidade e especificidade do método NRA comparando com os padrões ouro: Método das Proporções (MP) e Sistema Automatizado MGIT 960. De acordo com os resultados obtidos, comparando-se ao MP, detectou-se que o teste de NRA apresentou 99 % de sensibilidade e 100% de especificidade para detecção da resistência à INH. Já para a detecção da resistência à RMP o teste de RNA apresentou 95% de sensibilidade e 98% de especificidade. Os valores preditivos positivos foram de 99% e 100% para RMP e INH. Os valores preditivos negativos foram de 94% e 98% para RMP e INH. Comparando com os resultados do Sistema MGIT 960, nosso estudo mostrou que o teste de NRA apresentou 94% de sensibilidade e 93% de especificidade para a detecção da resistência a INH. Já para a detecção da resistência à RMP o NRA apresentou 95% de sensibilidade e 97 % de especificidade. Os valores preditivos positivos foram de 97% e 95% para RMP e INHA. Os valores preditivos negativos foram de 94% e 91% para RMP e INH. Foi observada uma excelente concordância entre os métodos de testes fenotípicos comparando-os a NRA com MP: 93% e 99% para RMP e INH. Comparando NRA com MGIT: 91% e 87% para RMP e INH. Nas despesas de custeio de 140 testes, a NRA gastou R\$ 177,80 e o MGIT 960 gastou R\$ 2.640,00. Os testes de MGIT 960 foram aproximadamente 138 vezes mais caros do que os testes de NRA. O tempo dos resultados foram semelhante nas duas metodologias, uma média de 10 dias para NRA (84,2% dos testes) e MGIT 960 (83,5% dos testes). A redução do tempo e dos custos na utilização deste método poderá se tornar uma ferramenta importante no programa de controle da tuberculose, principalmente na detecção de cepas de multirresistentes.

Palavras-chave: Tuberculose. Droga Resistente. Diagnóstico de Tuberculose. Nitrato Redutase.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains as one of the infectious diseases with the biggest burden on mankind, being considered as a worldwide public health concern. The goal of our study was to quickly identify *M. tuberculosis* strains resistant to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP) through the NRA. Such assay would be extremely valuable for the control of TB, given that treatment could be initiated sooner and the transmission chain of the organism would be interrupted. Thus, we used 140 isolates from the strain collection of the National Reference Laboratory for Tuberculosis to evaluate the sensitivity and specificity of the NRA when compared to the gold standard, the method of proportion (MP), and the automated MGIT 960 system. Our results showed that, compared to the MP, the NRA presented a sensitivity of 99% and specificity of 100% for the detection of INH resistance. For RMP resistance, the NRA showed a sensitivity of 95% and specificity of 98%. The positive predictive values showed 99% and 100% for INH and RMP. The negative predictive values showed 94% and 98% to RIF and INH. Compared to MGIT 960, the NRA showed 94% of sensitivity and 93% of specificity for the detection of INH resistance. For the detection of RMP resistance, the NRA showed 95% of sensitivity and 97% of specificity. The positive predictive values showed 97% and 95% for RMP and INH. The negative predictive values showed 94% and 91% for RIF and INH. Comparing the phenotypic tests was observed an excellent agreement between the methods: the NRA with MP, 93% and 99% for RIF and INH. Comparing the NRA with MGIT: 91% and 87% for RIF and INH. In costing expenses for 140 tests NRA spent R\$ 177,80 and MGIT 960 spent R \$ 2.640,00. The MGIT 960 tests were approximately 138 more expensive than the NRA tests. The time results of the two methods were similar, averaging 10 days for NRA (84.2% of the tests) and 960 MGIT (83.5% of the tests). The reduction in time to diagnosis achieved by this method may become an important tool in the control of tuberculosis in high-burden countries.

Keywords: Tuberculosis. Drug Resistance. Tuberculosis Diagnostic. Nitrate Reductase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Preparo das soluções e diluições dos fármacos para incorporação no meio de cultura Lowenstein-Jensen.....	26
Quadro 2 -	Concentração crítica dos fármacos empregados no teste de sensibilidade de <i>M.tuberculosis</i> e a proporção crítica de mutantes resistentes.....	27
Quadro 3 -	Preparo da solução e diluições do fármaco INH.....	36
Quadro 4 -	Preparo da solução do fármaco RMP.....	36
Figura 1 -	Kit/Teste que compoem a NRA.....	38
Fotografia 1 -	NRA mostrando sensibilidade a RMP e INH.....	44
Fotografia 2 -	NRA mostrando resistência a RMP e INH.....	44
Fotografia 3 -	NRA mostrando resistência só a RMP.....	45
Fotografia 4 -	NRA mostrando resistência só a INH.....	45
Quadro 5 -	Rifampicina (RMP) resultdos de NRA comparados com MP para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	47
Quadro 6 -	Rifampicina (RMP) resultdos de NRA comparados com MGIT 960 para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	48
Quadro 7 -	Isoniazida (INH) resultados de NRA comparados com MP para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	48
Quadro 8 -	Isoniazida (INH) resultados de NRA comparados com MGIT 960 para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	49
Quadro 9 -	Tempo de liberação dos testes de NRA.....	49
Quadro 10 -	Tempo de liberação dos testes de MGIT 960.....	50
Quadro 11 -	Despesas de custeio de NRA versus MGIT.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados de NRA comparados com MP para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	43
Tabela 2 -	Resultados de NRA comparados com MGIT 960 para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	43
Tabela 3 -	Resultados da acurácia de NRA aos fármacos RMP e INH em comparação com MP para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	46
Tabela 4 -	Resultados da acurácia de NRA aos fármacos RMP e INH em comparação com MGIT 960 para 140 cepas de <i>M. tuberculosis</i>	46

LISTA DE SIGLAS

AMI	Amicacina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCG	Bacilo de Calmett Guérin
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CICLO	Cicloserina
CIPRO	Ciprofloxacina
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMB	Etambutol
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FDC	Combinação de Dose Fixa
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
HCL	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de Confiança
INH	Isoniazida
IUATLD	<i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
L-J	<i>Lowenstein Jensen</i>
LRN	Laboratório de Referência Nacional
MAS-PCR	<i>Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction</i>
MDR	<i>Multidrug Resistant</i>
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MNT	Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose
MPT64	Imunoensaio Cromatográfico Rápido.
MR	Multirresistentes
NB2	Biossegurança Nível 2
NB3	Biossegurança Nível 3
OADC	Ácido Oleico, Albumina, Dextrose, Catalase
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNB	Ácido- <i>p</i> -nitrobenzóico
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifabutina
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
SITETB	Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose
SM	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TRM	Teste Rápido Molecular
TSA	Teste de Sensibilidade às Drogas
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPS	Unidade Primária de Saúde
USA	<i>United States of America</i>
XDR	Extensivamente Resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Dados epidemiológicos da tuberculose.....	16
2.2	Tuberculose e a resistência a fármacos.....	18
2.3	Métodos de diagnósticos.....	22
2.3.1	Metodologias fenotípicas para detecção de resistência a fármacos.	25
2.3.2	Método das proporções – padrão ouro.....	26
2.3.2.1	<i>Método automatizado para o teste de sensibilidade.....</i>	27
2.3.3	Método de nitrato redutase.....	28
2.3.4	Métodos genotípicos para detecção de resistência a drogas.....	29
3	JUSTIFICATIVA.....	30
4	OBJETIVOS.....	31
4.1	Geral.....	31
4.2	Específicos.....	31
5	METODOLOGIA.....	32
5.1	Local de estudo.....	32
5.2	Desenho do estudo.....	33
5.3	População do estudo.....	33
5.3.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	34
5.4	Considerações sobre os aspectos éticos.....	35
5.5	Materiais e métodos.....	35
5.5.1	Testes no método nitrato redutase.....	35
5.5.2	Teste no método das proporções.....	38
5.5.3	Testes no método automatizado.....	39
5.5.4	Análise dos dados.....	41
6	RESULTADOS.....	42
7	DISCUSSÃO.....	52
8	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXO A – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	63
	ANEXO B – CARTA-CIRCULAR Nº 004/2016 – CEP/ENSP.....	64

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK), como é popularmente conhecido. Caracteriza-se por ser uma bactéria intracelular facultativa que afeta principalmente os pulmões (células macrofágicas dos alvéolos pulmonares), podendo também afetar outros órgãos do corpo, tais quais: ossos, rins, nódulos linfáticos, meninges e outros tecidos (CANETTI *et al.*, 1963).

O bacilo dissemina-se por meio do ar transportado nos aerossóis expelidos pela tosse, fala ou espirro. Muitas das vezes o doente não sabe que é portador da doença, fator que propicia a sua disseminação. Os sintomas mais comuns são tosse, cansaço, inapetência, perda de peso e febre (que pode ser acompanhada de calafrios e sudorese noturnos). A febre quase sempre ocorre em níveis baixos, principalmente no final da tarde. Na fase avançada da tuberculose pulmonar ganham importância os sintomas localizados, como hemoptise, ou seja, a eliminação de sangue no escarro (BATES, 1993).

Alguns aspectos sobre a epidemiologia da tuberculose têm sido discutidos amplamente, como, por exemplo, a relação entre o número de indivíduos com a doença e a situação sócio-econômica de uma determinada região ou país. Além disso, a doença é transmitida mais facilmente em situações de aglomeração, desnutrição e pobreza, características das nações em desenvolvimento (LIMA FILHO, 1993; WHO, 2008).

As bactérias que causam a tuberculose podem desenvolver resistência aos fármacos utilizados para curar a doença. Tuberculose multirresistente (MDR-TB) é a tuberculose que não responde a isoniazida e a rifampicina, as duas drogas anti-TB mais poderosas. As razões pelas quais a multirresistência continua a surgir e a se espalhar são o uso irregular dos medicamentos, tratamento inadequado, transmissão pessoa a pessoa, entre outros (WHO, 2015).

A maioria das pessoas com tuberculose obtém a cura seguindo rigorosamente regime de seis meses de tratamento com fármacos que são fornecidas pelo governo por meio das Unidades de Saúde aos pacientes com apoio e supervisão. Uso inadequado ou incorreto de medicamentos antimicrobianos, ou uso de formulações ineficazes de drogas (por exemplo, uso de drogas individuais, medicamentos de má qualidade ou más condições de armazenagem) e a interrupção precoce do tratamento pode causar resistência aos medicamentos (WHO, 2015).

Em muitos países, uma das razões para a falta de acesso ao diagnóstico e tratamento da tuberculose é que a rede para a gestão dos programas de tuberculose é demasiadamente centralizada. A dificuldade de acesso às unidades de saúde é uma das razões pelas quais as pessoas com tuberculose não são precocemente diagnosticadas, podendo também ter um

impacto negativo sobre a adesão ao tratamento. O acesso aos cuidados de saúde pode ser afetado por fatores sociais e políticos (como o estigma e na discriminação, e a disponibilização de serviços transfronteiriços aos migrantes), além de barreiras econômicas (por exemplo, o custo de transporte) (WHO, 2015).

No entanto, houve grandes progressos na cobertura do teste de sensibilidade às drogas (TS) entre 2013 e 2014. Em todo o mundo, 12% dos pacientes com confirmação bacteriológica e 58% dos pacientes com tuberculose previamente tratados foram testados para a resistência às drogas em 2014; acima dos 8,5% e 17%, respectivamente, em 2013 (o que representa um aumento proporcional de 43% e 223%, respectivamente). A cobertura foi maior na região europeia (97% dos novos casos); nas regiões Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental combinados, dois terços dos casos previamente tratados foram submetidos ao TS (WHO, 2015).

A detecção microbiológica e de sensibilidade aos fármacos da tuberculose usando diagnósticos rápidos recomendadas pela OMS, juntamente com um sistema operacional eficiente para a transferência de amostras e resultados (sistemas de informação), permite aos pacientes serem corretamente diagnosticados e iniciados no regime de tratamento mais eficaz o mais precocemente possível. Um dos principais componentes do primeiro pilar da estratégia pós-2015 STOP TB (programa da OMS) é o diagnóstico precoce da tuberculose, incluindo testes de sensibilidade universal às drogas. A orientação operacional sobre a implementação da estratégia exige que todos os pacientes recebam teste de sensibilidade pelo menos para rifampicina, com mais testes de sensibilidade aos medicamentos de primeira e de segunda linha para qualquer paciente encontrado com resistência à rifampicina (WHO, 2015).

Vários métodos de cultura e de testes de sensibilidade a fármacos não comerciais foram desenvolvidos, como o ensaio da redutase do nitrato (NRA). Este pode ser usado como um teste direto em amostras de escarro com baciloscopia positiva ou como um teste indireto em isolados de *M. tuberculosis* cultivado em meio sólido convencional. A acurácia dos estudos sobre o uso combinado (direto e indireto) mostrou que NRA é altamente sensível (97%, 95%, IC 95-98%) e específica (100%, 95% IC, 99-100%) para a detecção de resistência à rifampicina e isoniazida (sensibilidade, 97%; 95%; IC, 95-98%; especificidade, 99%; 95%, IC 99-100%) (WHO, 2011).

O método mais comum para o diagnóstico de tuberculose a nível mundial continua sendo a baciloscopia de escarro (desenvolvido há mais de 100 anos), onde as bactérias são observadas em amostras de escarro examinadas sob um microscópio. No entanto, a evolução dos diagnósticos de tuberculose nos últimos anos demonstra que o uso de testes moleculares rápidos para diagnosticar a tuberculose e TB-MDR está aumentando (WHO, 2015).

O acesso universal ao teste de sensibilidade a fármacos, tal como preconizado na estratégia STOP TB, é necessário para assegurar que todas as pessoas com tuberculose recebam tratamento adequado. A nitrato redutase é um método rápido de teste de sensibilidade direto ou indireto às drogas, essencial para identificar pacientes com risco de TB-MDR e deve ser uma prioridade nas estratégias de triagem. A resistência à rifampicina é um proxy confiável para TB-MDR, que, uma vez confirmada, torna-se necessário que a amostra seja submetida a testes de sensibilidade complementares de primeira e segunda linha com base na atual recomendação da OMS e na capacidade laboratorial disponível (WHO, 2011).

Perguntas Conductoras:

1) Como diagnosticar com rapidez cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina e à isoniazida encaminhadas ao laboratório do Centro de Referência Professor Hélio Fraga para teste de diagnóstico?

2) Qual a acurácia da técnica de nitrato redutase (NRA) em diagnosticar cepas de *M. tuberculosis* resistentes e sensíveis à rifampicina e isoniazida, quando comparadas ao método das proporções e MGIT 960 TB, métodos padrão para testes de sensibilidade, utilizados pelo laboratório do CRPHF?

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dados epidemiológicos da tuberculose

A tuberculose é uma doença tão antiga quanto a humanidade. Atualmente, continua sendo a doença infecto-contagiosa que mais causa óbitos de indivíduos no mundo, especialmente na Ásia e África. Lesões características da doença foram encontradas em múmias com 5.000 anos de idade e no início do século XIX, a mortalidade na Europa era de 200 a 300 indivíduos por 100.000 habitantes (BAPTISTA *et al.*, 2002; WHO, 2015).

Muitas pessoas erroneamente acham que a tuberculose foi erradicada. Na verdade, de acordo com a OMS, a tuberculose foi a doença que mais matou em 2014. Nesse mesmo ano 9,6 milhões de pessoas ficaram doentes com tuberculose e 1,5 milhões morreram da doença. Mais de 95% das mortes por TB ocorrem em países de baixa e média renda, e está entre as 5 maiores causas de morte de mulheres com idades entre 15 a 44 anos. Estima-se que 1 milhão de crianças ficaram doentes com TB e 140.000 crianças morreram de TB. Um número estimado de 480.000 pessoas desenvolveram TB multirresistente (MDR-TB), sendo mais da metade desses casos na Índia, República Popular da China e Federação Russa. Estima-se que cerca de 9,7% dos casos de MDR-TB tinha tuberculose extensivamente resistente - XDR-TB (WHO, 2015).

A tuberculose é um líder na mortalidade de pessoas HIV/AIDS: em 2015, uma em cada três mortes de HIV foi devido a TB. Pelo menos um terço das pessoas que vivem com HIV no mundo em 2014 foram infectadas com a bactéria da tuberculose. As pessoas que vivem com HIV são 20 a 30 vezes mais propensas a desenvolver a tuberculose ativa do que as pessoas sem HIV, e formam uma combinação letal, cada um acelerando o progresso do outro. Em 2014 cerca de 0,4 milhões de pessoas morreram de tuberculose associada ao HIV. Aproximadamente, um terço das mortes entre as pessoas que viveram com HIV/AIDS foram devido a TB. Nesse mesmo ano havia cerca de 1,2 milhões de novos casos de TB entre pessoas que eram HIV-positivos, 74% dos quais viviam na África (WHO, 2015).

Em 2014, o maior número de casos novos de tuberculose ocorreu no Sudeste da Ásia e Regiões do Pacífico Ocidental, respondendo por 58% dos novos casos no mundo. No entanto, a África carrega o fardo mais grave, com 281 casos por 100.000 habitantes (em comparação com uma média global de 133). Ainda em 2014, cerca de 80% dos casos de TB relatados ocorreram em 22 países. Os seis países que se destacaram com o maior número de casos incidentes foram: Índia, Indonésia, Nigéria, Paquistão, República Popular da China e da África do Sul. Alguns países estão experimentando um grande declínio nos casos, enquanto em outros

os números estão caindo muito lentamente. Brasil e China, por exemplo, estão entre os 22 países com um declínio sustentado em casos de TB nos últimos 20 anos (WHO, 2015).

A meta do Objetivo de Desenvolvimento do Milênio de deter e reverter a epidemia de TB em 2015 foi cumprido globalmente. A incidência de TB caiu em uma média de 1,5% ao ano desde 2000, e agora é 18% inferior ao nível de 2000. A taxa de mortalidade da tuberculose caiu 47% entre 1990 e 2015. Estima-se que 43 milhões de vidas foram salvas através de diagnóstico e tratamento da TB entre 2000 e 2014 (WHO, 2015).

No Brasil, calcula-se que mais de 60 milhões de pessoas estejam infectadas pelo bacilo da tuberculose. Mais de 90 mil casos da enfermidade foram notificados no ano de 2006, com a ocorrência de mais de 4000 mil óbitos, sendo que cerca de 1400 com infecção concomitante por HIV. Em 2013, o Brasil diagnosticou 71.123 casos novos de tuberculose, perfazendo um coeficiente de incidência de 35,4/100.000 habitantes e está incluído entre os 22 países onde ocorrem aproximadamente 80% de todos os casos novos de tuberculose a cada ano, ocupando o décimo quinto lugar em número de casos (WHO, 2013).

A persistência do quadro epidemiológico da doença é historicamente multifatorial, e está relacionada a fatores sócio-demográficos ligados principalmente à saúde e aos seus determinantes sociais, como os seguimentos populacionais mais vulneráveis, o advento da endemia do HIV, e o aumento dos índices de migrações internas e externas (SAN PEDRO, OLIVEIRA, 2013).

Entre as estratégias de controle da tuberculose preconizadas pela OMS encontra-se a necessidade de atenção especial para certos grupos populacionais e pessoas em situações particulares que são associadas a um risco maior de contrair a tuberculose, tais como etilistas e usuários de drogas, que, além de desenvolverem sensibilidade maior para infecções do trato respiratório, convivem em ambientes, onde as drogas são compartilhadas, que podem facilitar a transmissão do *M. tuberculosis*. Além disso, a dependência de drogas está associada com uma progressão mais rápida da tuberculose, e o alcoolismo é um fator associado com o risco aumentado de morte nesses pacientes (HADDAD, 2005).

Além disso, contribuem para este cenário o envelhecimento da população mundial, o aumento na taxa de abandono de tratamento contra a tuberculose e o aparecimento da resistência a múltiplos medicamentos (CORBETT *et al.*, 2003). A transmissão destes bacilos é uma séria questão de saúde pública, aumentando o número de casos, o número de óbitos e o custo do tratamento. Esta situação levou a OMS a detalhar um conjunto de intervenções que deviam ser implantadas para alcançar metas de redução da doença até o ano de 2015 (WHO, 2006).

Deficiências no processo de detecção da doença, assim como falência de alguns procedimentos terapêuticos, têm contribuído para o surgimento de bactérias resistentes a um ou mais antibióticos (MDR – resistência a múltiplas drogas e XDR – extensivamente resistente a drogas), constituindo um problema grave e uma verdadeira ameaça aos programas de controle da tuberculose. Em 2013, foram notificados e acompanhados no Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose (SITE TB): 148 casos novos de monorresistência, 50 de polirresistência, 525 de TB-MDR, 21 de TB-XDR. Mundialmente houve uma estimativa de 480.000 mil casos novos de TB MDR em 2014, possivelmente um quarto deles, 123.000, foram diagnosticados e tratados e apenas metade foram curados (BRASIL, 2014; WHO, 2015).

A TB resistente a medicamentos representa uma ameaça importante ao controle da tuberculose em todo o mundo. Até o final de 2014, os dados sobre a resistência aos medicamentos antituberculose estavam disponíveis para 153 países, representando mais de 95% da população do mundo de casos estimados de tuberculose. Oitenta destes países têm sistemas de vigilância contínua, enquanto os outros dependem de levantamentos epidemiológicos (WHO, 2015).

2.2 Tuberculose e a resistência aos fármacos

Desde 1994, a OMS e a *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD) realizam um trabalho de vigilância de resistência às drogas do tratamento da tuberculose em um projeto de nível global. Mostrou-se através dos resultados do estudo que em todas as áreas geográficas analisadas o *M. tuberculosis* resistente está presente (BRASIL, 2002).

O grande problema atual no mundo e no Brasil é que o bacilo vem progressivamente adquirindo resistência aos medicamentos, sendo também transmitido aos novos casos. Para fins epidemiológicos, quando o paciente com tuberculose desenvolve resistência e infecta outra pessoa e esta adoece, diz-se que o caso novo apresenta resistência primária. O conhecimento das taxas de resistência permite avaliar a qualidade dos programas da tuberculose de um país, e possibilita a modificação de esquemas terapêuticos vigentes (BRASIL, 2005).

Um dos principais objetivos do controle efetivo da TB é a prevenção da resistência aos medicamentos resultantes de uma programação variada, promoção da saúde e fatores relacionados aos pacientes. Fornecimento irregular de drogas, má qualidade das drogas, os erros clínicos na prescrição de medicamentos, falta de adesão do paciente ao tratamento e abandono são determinantes conhecidos de resistência aos medicamentos anti-TB. A transmissão

posterior de bacilos resistentes é facilitada pelo controle de infecção inadequada, especialmente em ambientes com aglomerações (WHO, 2008).

Isto vem gerando um aumento do número de casos de tuberculose multirresistente (TBMR: resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida), e até mesmo de casos de tuberculose super-resistente (TB XDR), que é a tuberculose multirresistente com resistência concomitante a uma quinolona e a uma droga injetável: amicacina, canamicina ou capreomicina. O aumento gradativo da resistência aos fármacos específicos fez com que o Ministério da Saúde, em 2009, mudasse o esquema padronizado de tratamento inicial da tuberculose de três para quatro fármacos: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. O Brasil adota o esquema básico, que são dois meses administrando os antibióticos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol e quatro meses de rifampicina e isoniazida para o tratamento de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), assim como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono (BRASIL, 2007).

Fármacos de segunda linha, também conhecidos como esquema de drogas especiais, são indicadas para o tratamento da tuberculose multirresistente que estão sob os cuidados de um Sistema de Vigilância Epidemiológica, pois a disseminação de cepas de *M. tuberculosis* resistente pode ter grande impacto na epidemiologia e controle da doença (BRASIL, 2008).

A resistência à fármacos pelo *M. tuberculosis* surge por mutação espontânea, ocorrendo independentemente do contato prévio entre o bacilo e as drogas. Em toda população de células sensíveis existe uma pequena proporção de mutantes resistentes, que varia de um em cada 10^8 células por geração. A resistência aos fármacos pelo bacilo da tuberculose é resultado da interrelação entre o fenômeno da mutação espontânea e a seleção de população predominantemente resistente como consequência de um tratamento irregular e/ou inadequado. Este processo seletivo é conhecido como resistência “adquirida” (BRASIL, 2005).

Os tratamentos eficazes com fármacos foram desenvolvidos primeiramente na década de 1940. O fármaco de primeira linha anti-TB mais eficaz, rifampicina, tornou-se disponível na década de 1960. Sem tratamento, a taxa de mortalidade é elevada. Estudos da era pré-quimioterapia constataram que cerca de 70% das pessoas com baciloscopia positiva com TB pulmonar morriam em até 10 anos, e que esse número era de 20% entre os casos de cultura positiva de TB pulmonar (WHO, 1997).

Desde a introdução da estreptomicina em 1946, muito se avançou no tratamento da tuberculose. No entanto, ainda é necessário o uso simultâneo de pelo menos três medicamentos por um período prolongado de no mínimo seis meses. Quanto maior o tempo de tratamento, maior é a probabilidade de abandono, com suas implicações biológicas, econômicas,

psicológicas e sociais. O custo por paciente tratado está geralmente na faixa de US \$ 100 – 1000 para tuberculose sensível aos fármacos de primeira linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (esquema básico) em um regime de seis meses; porém, este valor aumenta drasticamente para US \$ 2000 - 20000 nos casos de TB-MDR sem levar em consideração os custos de internação, social e psicológico. (WHO, 2016).

Como resultado de novas evidências em alguns países, a OMS divulgou uma orientação em maio de 2016, onde recomenda um regime padronizado de TB – MDR mais curto, de 9 a 12 meses de tratamento para todos os pacientes (excluindo mulheres grávidas) com TB pulmonar MDR/RR, que não seja resistente a medicamentos de segunda linha. O custo desse regime com fármacos encurtado é de US \$ 1000 por pessoa. (WHO, 2016).

Vários antibióticos foram testados em triagens clínicas em diferentes combinações, e foi verificado que até o momento o tratamento mais efetivo contra a tuberculose deve incluir os fármacos isoniazida (INH) e rifampicina (RMP) que representam a mais potente combinação contra o bacilo da tuberculose, e constituem a base do tratamento e que associados com a pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB), constituem o esquema primário. Esse tratamento é prolongado, com duração de aproximadamente seis meses. Caso ocorra resistência a esses fármacos é necessário a utilização de outros fármacos: estreptomicina (SM), cicloserina (CICLO), rifabutina (RIF), ciprofloxacina (CIPRO), amicacina (AMI), entre outros, que apresentam maior custo e efeito tóxico para os pacientes e o período de tratamento supera seis meses (WHO, 1997).

Em estudo realizado há duas décadas no I Inquérito Nacional de Resistência para os fármacos utilizadas no tratamento da tuberculose foi verificado que em seis mil cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em Unidades Primárias de Saúde – (UPS) a resistência primária a pelo menos um fármaco foi de 7% e a dois fármacos (rifampicina+isoniazida, MDR) de 1% (PABLOS-MENDEZ *et al.*, 1998).

Devido às dificuldades no tratamento de pacientes com TB-MDR, determinar a proporção de casos de tuberculose com resistência à isoniazida e à rifampicina é extremamente importante. Além disso, a resistência a estes dois fármacos pode ser mensurada de forma confiável por meio de técnicas padronizadas, resultando em altas sensibilidades e especificidades. Portanto, os testes de sensibilidade para ambas devem formar a espinha dorsal de toda a vigilância fármaco-resistente. Entre os outros fármacos de primeira linha anti-tuberculose, o teste para estreptomicina e etambutol também podem ser incluídos no tratamento, uma vez que estes medicamentos ainda são utilizados em alguns países.

Os mecanismos bioquímicos e genéticos associados à multirresistência em *M. tuberculosis* são objetos de estudo há vários anos. Diversas investigações foram realizadas com objetivo de entender os mecanismos de resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina. A rifampicina (RMP) é um derivado semi-sintético de um grupo de antibióticos estruturalmente complexos, as rifamicinas, que são derivadas de *Amycolatopsis mediterranei* (anteriormente classificado como *Streptomyces mediterranei*). Este fármaco atua na inibição da RNA polimerase dependente de DNA, levando a supressão da síntese de RNA visto que o sítio de atuação do fármaco é a subunidade beta desta enzima. Assim, ocorre o bloqueio da síntese de proteínas provocando a morte da célula bacteriana (FEMLE *et al.*, 1995).

Uma das principais causas de falência no tratamento da tuberculose se deve a resistência a rifampicina. Além de exercer um potente efeito bactericida inicial sobre os bacilos metabolicamente ativos, este fármaco possui excelente efeito esterilizante tardio agindo sobre bacilos semidormentes. Foi este efeito esterilizante da rifampicina aliado à eficácia adicional da pirazinamida que possibilitou a redução do tratamento de um ano para seis meses (WHO, 2011).

Testes rápido de resistência à rifampicina na maioria dos contextos contra TB são usados e a resistência à rifampicina é quase invariavelmente associada com a resistência à isoniazida. As vantagens do teste rápido para a rifampicina incluem a identificação precoce de pacientes em regimes de tratamentos inadequados com os fármacos de primeira linha, a triagem rápida de pacientes com risco de TB-MDR, e a interrupção precoce da transmissão de TB-MDR (WHO, 2008).

O Inquérito Nacional de Resistência, em 1998, avaliou os testes de sensibilidade pelo método das proporções de cerca de seis mil pacientes os resultados destes testes mostraram que 0,2% desses pacientes tinham resistência primária só à rifampicina, 3,7% só à isoniazida (BRASIL, 2002).

A isoniazida (INH) é a hidrazida do ácido nicotínico, sendo uma dos fármacos mais potentes contra o *M. tuberculosis* e o *M. bovis*. Este medicamento penetra na maioria dos tecidos, incluindo espaços contendo fluidos, como o líquido, e também penetra e atua em macrófagos, sendo ativa contra bacilos intracelulares assim como para microorganismos extracelulares. Este fármaco é bactericida, e seus efeitos são exercidos em bacilos com crescimento ativo. Uma das hipóteses que tentam explicar seu mecanismo de ação é que este fármaco inibe a síntese dos ácidos micólicos, que são importantes componentes da parede celular micobacteriana. Como estes compostos são exclusivos das micobactérias, isto explicaria o alto grau de seletividade na ação da isoniazida. Entretanto, ao longo dos anos, muitos

componentes do *M. tuberculosis* têm sido indicados como possíveis alvos de ação da isoniazida, pois a resistência a INH está relacionada em muitas cepas com a perda da atividade catalase-peroxidase, que é responsável pela conversão da isoniazida (pro-droga) para ácido isonicotínico (forma ativa da droga) (RILEY, 1996).

2.3 Métodos de diagnósticos

Testes laboratoriais de sensibilidade de bacilos da tuberculose para fármacos servem a três objetivos principais: em primeiro lugar, eles podem ser usados como um guia na escolha do primeiro tratamento de quimioterapia a ser dado ao paciente (CANETTI *et al.*, 1963).

Em segundo lugar, eles podem ter valor na confirmação de que a resistência aos medicamentos surgiu quando um paciente não mostrou uma resposta satisfatória ao tratamento bacteriológico, e poderão orientar a escolha de drogas diferentes no decorrer de um tratamento (CANETTI *et al.*, 1963).

Em terceiro lugar, eles podem ser empregados para estimar a prevalência de resistência primária e da adquirida aos medicamentos na comunidade. Para cada um destes fins, é de grande importância usar uma técnica de confiança na execução do teste. Infelizmente, muitas técnicas e métodos de interpretação de resultados estão em uso e é provável que muitas destas técnicas não distingam com precisão entre organismos sensíveis e resistentes e por esta razão, recomenda-se que qualquer método utilizado deva ser padronizado (CANETTI *et al.*, 1963).

Os testes de sensibilidade em uso atualmente podem ser classificados, como direto ou indireto. Em ensaios diretos, o homogeneizado da expectoração ou outro material patológico é cultivado diretamente em meio contendo droga. Os testes são realizados apenas nas amostras que contêm um número suficiente de bacilos álcool-ácido resistentes como mostrado pelo exame de baciloscopia (pelo menos um bacilo em dez campos microscópicos. Os procedimentos exatos a serem adotados são também determinados na maioria dos métodos pelo número de bacilos visto em exames baciloscopia (WHO, 2011).

Em muitos laboratórios, testes de sensibilidade diretos não são executados em parte, porque não é considerado prático examinar esfregaço como rotina antes da inoculação do meio de cultura e porque os testes de sensibilidade diretos realizados por algumas técnicas não são considerados tão confiáveis como os feitos pelo método indireto. Seja qual for o método utilizado, testes indiretos serão necessários para culturas em que o exame baciloscópico for negativo. A razão principal para a utilização de ensaios diretos é que eles reduzem o tempo entre a obtenção da amostra do paciente e a leitura da sensibilidade de resultado de sete

semanas, (tempo necessário para o resultado do ensaio indireto), para cerca de quatro, semanas quando semeados em meio sólido (WHO, 2011).

Com alguns pacientes, por exemplo, aqueles com doença progressiva prestes a receber um retratamento de quimioterapia, é importante para a obtenção dos resultados um teste confiável, logo que possível; testes de sensibilidade diretos são particularmente valiosos nestas circunstâncias. Em testes indiretos, o meio contendo o fármaco é inoculado a partir da cultura primária de diagnóstico (CANETTI *et al.*, 1963).

Adicionalmente, Canetti *et al.*, (1963), classifica os testes indiretos em três categorias principais, sendo elas:

(1) Método de Concentração Absoluta – são utilizadas várias diluições sequenciais de cada fármaco, sendo que a resistência é indicada pela concentração mais baixa do fármaco que inibe o crescimento;

(2) Método da Razão de Resistência – a proporção da concentração inibitória mínima (MIC) para a cepa do paciente e para o MIC da cepa de referência de droga sensível são medidas em um mesmo experimento;

(3) Método de Proporção – O padrão de referência é o método das proporções, em que o crescimento (cultura) de organismos sobre um meio contendo drogas contra TB é comparado com o crescimento de um meio de controle livre de drogas. A percentagem de crescimento em ambos os meios é comparada e os resultados geralmente só estão disponíveis entre 2 e 3 meses, após o recebimento da amostra. Enquanto isso, os pacientes são colocados em terapia padrão anti-tuberculose.

Vários métodos de cultura e testes de sensibilidade a drogas não comerciais foram desenvolvidos especificamente para cenários com limitações de acesso à infraestrutura de laboratório sofisticado e conhecimentos técnicos. Vários métodos rápidos e baratos têm mostrado promessa inicial. Um desses métodos foi a técnica de nitrato redutase (WHO, 2011).

A confirmação de TB pulmonar em cultura líquida pelo sistema MGIT 960 pode ser obtida em menos de duas semanas, e o testes de sensibilidade resulta em um adicional de duas semanas. A OMS aprovou o uso de cultura líquida e testes de sensibilidade em ambientes de baixa e média complexidade, desde que haja as medidas de infraestrutura e de biossegurança nesses lugares, e que a acessibilidade e a sustentabilidade estejam assegurados (WHO, 2009).

O Sistema MGIT 960 foi projetado para atender às necessidades dos laboratórios com médio e alto volume de testes de diagnóstico, com monitorização contínua que identifica tubos positivos à medida que ocorre a reação positiva, liberando resultados mais rápidos que

podem melhorar o atendimento ao paciente, reduzindo os custos de saúde como as hospitalizações e na otimização de equipamentos (BECTON DICKINSON, 1994).

Infelizmente, o nível de sofisticação e os custos associados como monitorização contínua da temperatura ambiental onde o equipamento fica instalado, os custos dos Kits SIRE e dos tubos BBLs, que formam a bateria do teste de sensibilidade, bem como a manutenção preventiva do sistema MGIT 960 e da infraestrutura laboratorial fizeram da sua aplicação geral impraticável em muitos laboratórios de saúde pública do nosso País como também de outros Países em desenvolvimento.

O desempenho de NRA foi avaliado num estudo multicêntrico por Martin *et al.* (2005), que determinou a susceptibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* às drogas antituberculose de primeira linha. A precisão foi maior do que 97% para a INH e RMP. Em outro estudo, Martin *et al.* (2008) relata a avaliação da NRA para ofloxacina, um medicamento de segunda linha, e encontrou acordo completo com o MP em agar. Portanto, a NRA tem a capacidade de ser usada também para avaliar fármacos de segunda linha (GUPTA *et al.*, 2011; MARTIN *et al.*, 2008).

Uma característica notável do teste de sensibilidade de NRA consiste na sua capacidade de proporcionar resultados confiáveis em amostras com baixa carga bacilar e provou ser altamente específica para o complexo *M. tuberculosis*. No entanto, a detecção de MNT positivas para nitrato redutase não pode ser excluída (ROSALES *et al.*, 2011).

A capacidade para reduzir o nitrato é típica para o *M. tuberculosis*, embora algumas outras espécies de micobactérias possam originar resultados positivos, como as micobactérias não causadoras de tuberculose: *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens*, complexo *M. terrae*, e algumas de crescimento rápido também partilham desta característica (GUPTA *et al.*, 2011).

Cepas de nitrato reductase negativa de *M. tuberculosis* são raras (<1%) e criariam resultados falsos, uma vez que o controle seria negativo e o teste, portanto, inválido. O nitrato pode ser reduzido a óxido nítrico além do nitrito o que não pode ser detectado pelos reagentes de Griess. Nesse caso adiciona-se pó de zinco a todos os tubos negativos. O zinco reduz o nitrato rapidamente e um teste verdadeiro negativo ficará vermelho enquanto não haverá mudança de cor em um tubo onde a redução passou além do nitrito. (ANGEBY *et al.*, 2002).

Como podemos observar, a detecção de MNTs positivas para nitrato redutase não pode ser excluída. Além do PNB o teste TB Ag MPT64 imunoensaio cromatográfico rápido foi usado em nosso estudo para identificação qualitativa do complexo *M. tuberculosis*, que utiliza o anticorpo monoclonal anti-MPT64, que é uma proteína de 24 kDa segregada por este agente patogênico. É um teste de execução fácil em laboratórios clínicos, sem precisar de qualquer complexidade técnica.

Os métodos existentes para testes de sensibilidade às drogas ou são lentos, como o método das proporções em meio sólido, ou são caros, como é o método MGIT 960. Sistemas de testes automatizados como estes são rápidos e fáceis de usar, porém requerem investimentos pesados em equipamentos e custos altos em manutenção (ANGEBY *et al.*, 2002).

Vários métodos alternativos foram propostos. Métodos de genética molecular, tais como o ensaio de sonda (Innogenetics, Ghent, Bélgica), são rápidos, mas demasiadamente caros, para ser usado em locais com poucos recursos e foram desenvolvidas principalmente para testes de susceptibilidade a RMP (ANGEBY *et al.*, 2002).

Uso de testes rápidos para detectar a resistência a rifampicina e isoniazida teriam melhores resultados do que os testes para detectar resistência só a rifampicina. A detecção de pacientes com resistência isolada a isoniazida pode proporcionar uma oportunidade para iniciar um tratamento eficaz antes de desenvolver resistência adicional à rifampicina (WHO, 2011).

Ensaio colorimétricos com base na redução de corantes, isto é, azul de Alamar ou amarelo de tetrazolio (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), foram testados com algum sucesso. No entanto, a aplicação de meios líquidos em formato de microplacas (96 poços) é complexa e poderia haver risco biológico e o risco de uma contaminação cruzada não seria descartado (ANGEBY *et al.*, 2002).

O teste de nitrato redutase é rápido, barato e fácil de executar, não requer equipamentos sofisticados nem substratos ou reagentes caros. Acreditamos que a NRA pode tornar-se uma ferramenta importante para a detecção rápida de cepas MDR de *M. tuberculosis* em todo o mundo (MARTIN *et al.*, 2008).

2.3.1 Metodologias fenotípicas para detecção de resistência aos fármacos

Em linhas gerais, métodos fenotípicos são aqueles baseados em características de crescimento bacteriológico das cepas na presença ou ausência do fármaco a ser testado. Quando existe a possibilidade de um caso de tuberculose ser multirresistente por suspeita de resistência primária, abandono do tratamento ou a ausência de resposta ao tratamento padronizado, se faz necessário o diagnóstico de certeza, por meio do teste de sensibilidade. Estes procedimentos podem ser conseguidos através de métodos tradicionais como o método das proporções, descrito por Canetti, Rist & Grosset em 1963, e por métodos rápidos como BACTEC MGIT 960, que usa meio de cultura líquido e constitui atualmente a opção mais utilizada por apresentar a vantagem do menor tempo de incubação e a leitura automatizada (BRASIL, 2005).

2.3.2 Método das Proporções – Padrão Ouro

Método não automatizado, o método das proporções ainda é o mais utilizado em laboratórios de países em desenvolvimento, muitas vezes como única opção para determinação de resistência. Neste aspecto, serve como padrão-ouro da determinação bacteriológica (ou *in vitro*) de sensibilidade ou resistência a determinado fármaco testado. A leitura dos resultados é efetuada de forma visual, com a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nos tubos de meio sólido semeados, após 28 dias de incubação (BRASIL, 2005).

De acordo com as normas de biossegurança, este método deve ser executado segundo a técnica asséptica, em cabine de segurança biológica classe II B2 ou classe II B3. O técnico deverá utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs) como luva, respirador N95 e avental descartável para realizar o procedimento de diluições e semeadura das amostras no meio de cultivo, com ou sem fármacos. Após o encerramento da atividade os EPIs devem ser descartados em recipiente próprio para esterilização.

O meio mais utilizado para a realização do método das proporções é o meio comercial desidratado Lowenstein-Jensen (LJ), que é preparado conforme as orientações do fabricante, sendo os fármacos incorporados ao mesmo antes da coagulação (BRASIL, 2005).

Quadro 1 – Preparo das soluções e diluições dos fármacos para incorporação no meio de cultura Lowenstein-Jensen (BRASIL, 2008).

FÁRMACO	POTÊNCIA (%)	PESAGEM (g)	DILUENTE (10 mL)	DILUIÇÕES	PARA 200 mL de LJ
INH	100	0,1	H ₂ O destilada	1/100	0,4
RMP	100	0,1	Etileno glicol	-	0,8
*SM	50	0,2	H ₂ O destilada	1/10	0,8
EMB	100	0,1	H ₂ O destilada	1/10	0,4

*Calcular a potência do antibiótico

A verdadeira potência de um fármaco é o número de microgramas do fármaco ativo por miligrama do peso total do produto. Nem todos os fármacos antimicrobianos foram isolados na sua forma pura, e uma parte do seu peso pode ser devida a impurezas ou ao sulfato ou a outro componente radical da molécula. Cada lote de cada fármaco pode ter variação dos lotes anteriores, e a potência de um lote pode não ser a mesma de um novo lote.

Quadro 2 – Concentração crítica dos fármacos empregados no teste de sensibilidade de *M. tuberculosis* e a proporção crítica de mutantes resistentes (BRASIL, 2008).

FÁRMACO	CONCENTRAÇÕES (µg/mL)	PROPORÇÕES (>=1,0)
Isoniazida (INH)	0,2	>=1,0
Rifampicina (RMP)	40,0	>=1,0
Estreptomicina (SM)	4,0	>=1,0
Etambutol (EMB)	2,0	>=1,0

2.3.2.1 Método automatizado para o teste de sensibilidade

Os laboratórios de tuberculose foram um dos últimos a incorporar técnicas automatizadas na sua rotina. Somente no final dos anos 70 os trabalhos de Cummings *et al.*, (1975), Middlebrook *et al.*, (1977) e Kertcher *et al.*, (1978), culminaram com a introdução de um sistema radiométrico rápido e semi automatizado para o diagnóstico da tuberculose. Este sistema, desenvolvido pela Becton Dickinson (East Rutherford, USA), usa o meio líquido radiométrico BACTEC 12B que baseia-se na detecção de ^{14}C ácido palmítico, mostrando grande acurácia quando comparado a métodos tradicionais. O desenvolvimento de sistemas de lise de células sanguíneas consagrou este sistema no isolamento de micobactérias de pacientes HIV positivos. Além do isolamento, este sistema permitiu separar o “complexo” *M. tuberculosis* das demais espécies, além de se tornar padrão-ouro em testes de susceptibilidade a antimicrobianos nos países desenvolvidos nestes últimos 20 anos (BRASIL, 2005).

Os métodos convencionais de teste de sensibilidade para o *M. tuberculosis* são lentos e trabalhosos. A utilização do BACTEC 460TB, sistema radiométrico, resultou em um ganho substancial em rapidez, mas os custos do sistema e a exigência do uso de material radioativo tornaram este método inadequado para muitos dos países em desenvolvimento (BRASIL, 2005).

Atualmente, o método radiométrico foi substituído pelo BACTEC MGIT 960TB na sua versão totalmente automatizada, utilizando um tubo que contém um meio de cultura líquido modificado (BBL middlebrook 7H9 broth) dotado de um sensor interno de detecção de crescimento bacteriano que de acordo com o fabricante pode ser calorimétrico, fluorimétrico ou de pressão. Estes sistemas comerciais utilizam o mesmo protocolo do método das proporções na versão simplificada do teste, que consiste apenas em uma concentração de cada droga a ser utilizada no teste de sensibilidade (BRASIL, 2005).

O sistema MGIT 960 detecta crescimento bacteriano em meio líquido, possibilitando um diagnóstico precoce da cultura em até 21 dias, entretanto, estudos mostraram uma contaminação maior do que no meio LJ, 3,7% contra 1,2% respectivamente (Segundo Consenso TB, 2004). Na preparação dos testes de sensibilidade, os tubos MGIT são abertos pelo menos três vezes para que se prepare e finalize o teste, há necessidade de cuidados constantes para evitar a contaminação que leva à invalidação do teste. (BRASIL, 2005).

Todos esses sistemas permitem a introdução de outros antibióticos/substâncias inibidoras, além do seu uso para identificação através de sondas genéticas, cromatografia líquida e outros métodos para o diagnóstico final. Todos os sistemas desenvolvidos até o presente utilizam o meio 7H9 de Middlebrook como meio de cultura principal, variando no modo de detecção e nos suplementos para prevenir a contaminação (BRASIL, 2005).

2.3.3 Método de nitrato redutase

O teste da redução do nitrato é usado amplamente para diferenciar *M. tuberculosis* das micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT). O embasamento químico da detecção usada na redução do nitrato foi descoberta em 1879 por Griess o método recebeu este mesmo nome.

Baseado nesse conceito, o ensaio de nitrato redutase para testar a sensibilidade aos fármacos de *M. tuberculosis* realizada em meio sólido LJ foi recentemente descrito. O método é baseado na habilidade do *M. tuberculosis* em reduzir o nitrato a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase. A presença do nitrito é detectada pelo aparecimento de cor rosa após a adição do reagente específico (ANGEBY *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2005).

Procedimentos de nitrato redutase foram padronizados, e protocolos de ensaio estão disponíveis em Angeby *et al.*, (2002). Como a NRA envolve meios de cultura sólidos, o próprio Manual de Procedimentos para teste de sensibilidade a medicamentos para *M. tuberculosis* pelo ensaio de nitrato redutase (NRA), descreve que os requisitos de segurança biológica são semelhantes àqueles para cultura sólida convencional (nível de segurança 2); no entanto, a NRA requer abertura regular de tubos, para a adição de reagente o que representa um risco significativo para geração de aerossóis. Isto deve ser feito dentro de uma cabine de segurança biológica adequada (MARTIN & PALOMINO, 2009; WHO, 2011).

O teste nitrato redutase é adequado para uso a nível de laboratório de referência no controle de tratamento e descentralização de testes de susceptibilidade desde que os laboratórios de nível mais baixo demonstrem proficiência no desempenho de cultura sólida.

Essa descentralização e testes de proficiência são avaliados pelos Laboratórios Central de Saúde Pública e Laboratórios de Referência Nacional (LRN) que mantem um programa de controle de qualidade externo dos isolados bacterianos, meios de cultura e reagentes produzidos pelos laboratórios da Rede e conveniados do SUS (BRASIL, 2008).

É indicado para testes diretos ou indiretos na triagem de pacientes com suspeita de TB-MDR, reconhecendo que o tempo para detecção de TB-MDR em aplicação indireta não é mais rápido do que pelos métodos convencionais de TS com cultura líquida. A confirmação laboratorial da tuberculose e a resistência aos medicamentos são essenciais para garantir que os indivíduos com tuberculose sejam diagnosticados corretamente e tenham acesso ao tratamento adequado o mais precocemente possível (WHO, 2011).

Fortalecimento dos laboratórios e novos testes de diagnósticos são cruciais para melhorar a proporção de casos de tuberculose notificados com um diagnóstico da tuberculose definitivo (bacteriologicamente confirmado), e para eliminarem discrepâncias de detecção e tratamento de tuberculose resistente a medicamentos (WHO, 2011).

2.3.4 Métodos genotípicos para detecção de resistência a fármacos

Os métodos genotípicos ou moleculares podem ser definidos como aqueles nos quais estudam determinadas regiões do DNA das cepas a serem testadas. Em linhas gerais, procura-se detectar alterações genômicas que resultem na resistência a drogas.

Nos isolados de culturas do complexo *M. tuberculosis*, em toda a população de células sensíveis existe uma pequena proporção de mutantes resistentes, que varia dependendo da droga e da concentração testada. Métodos de diagnóstico genotípicos usados no laboratório de bacteriologia da tuberculose do Centro de Referência Professor Hélio Fraga incluem o método do MAS-PCR (Multiplex Allele-Specific PCR), método de hibridação reversa “in house” (Reverse LineBlot assay), sequenciamento e Xpert MTB/RIF, também conhecido como Teste Rápido Molecular (TRM) (BRASIL, 2005; PNCT 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Este estudo consistiu em comparar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes à rifampicina e isoniazida por meio do método de nitrato redutase, o que seria de grande importância para o início precoce do tratamento, contribuindo para a quebra da cadeia de transmissão dos casos de tuberculose resistente e multirresistente.

O método de nitrato redutase utiliza aparelhagem básica de qualquer laboratório de bacteriologia, tendo seu custo reduzido se comparado a outros métodos disponíveis no mercado. O laboratório do CRPHF tem grande experiência em pesquisas de testes de diagnósticos para tuberculose, além de equipamentos capazes de dar apoio técnico para o êxito desse trabalho.

Disponibilizar um método alternativo rápido e de baixo custo para determinar a sensibilidade a antibióticos *in vitro* de isolados de cultura com o objetivo de encurtar o tempo para determinar o perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* será muito importante e útil para o programa de controle da tuberculose em pacientes com TB resistente à rifampicina e isoniazida.

Método de teste de sensibilidade em meio líquido possuem custos relativamente elevados para equipamentos e materiais de consumo, bem como a necessidade de identificação rápida (já que a taxa de recuperação de micobactérias não tuberculoza pode ser elevada), e a necessidade de medidas de controle de qualidade rigorosas para evitar a contaminação por outros microorganismos.

Usar novas metodologias que reduzam o tempo e os custos no diagnóstico da tuberculose resistente, haja visto que os métodos atuais utilizados são caros e laboriosos e nesse sentido o ensaio de nitrato redutase é muito promissor em razão de gerar resultados mais rápido e barato do que os demais métodos fenotípicos clássicos.

Recomendada em 2011 pela OMS, a NRA é um teste de diagnóstico para detecção microbiológica da tuberculose resistente. Testes de sensibilidade às drogas usando diagnósticos alternativos e rápidos permitem que os pacientes sejam diagnosticados corretamente e o regime de tratamento eficaz seja iniciado tão cedo quanto possível.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o desempenho do ensaio de nitrato redutase a partir de isolados de *M. tuberculosis*, com o propósito de determinar a sensibilidade da micobactéria à rifampicina e isoniazida em pacientes com tuberculose pulmonar.

4.2 Específicos

1. Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do método NRA quando comparado aos resultados obtidos por métodos fenotípicos (método das proporções e BACTEC MGIT 960).
2. Avaliar o tempo do método NRA para detecção da tuberculose resistente e multirresistente em relação ao método do BACTEC MGIT 960.
3. Avaliar os custos do método NRA para detecção da tuberculose resistente e multirresistente em relação ao método do BACTEC MGIT 960.

5 METODOLOGIA

5.1 Local de Estudo

O Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF) ligado à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, FIOCRUZ, tem como função o apoio técnico, desenvolvimento tecnológico e de pesquisa ao Programa Nacional de Controle da Tuberculose e outros órgãos do Ministério da Saúde com interface no controle das micobacterioses. Atualmente, suas atividades priorizam em nível nacional, avaliações operacionais e epidemiológicas e a vigilância nacional da tuberculose multirresistente, assim como a realização de pesquisas e ensino na área.

O CRPHF participa anualmente do controle de qualidade externo da baciloscopia e teste de sensibilidade por meio de comparações interlaboratoriais a nível internacional, incluindo os ensaios de proficiência encaminhados pelo Laboratório de Referência Supra Nacional (LRSN), para assessorar a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB) no acompanhamento, normalização, garantir a padronização de técnicas e avaliação das atividades desenvolvidas nos laboratórios de saúde pública (Brasil 2008).

A infraestrutura do CRPHF é composta de um prédio técnico e outro administrativo, um prédio com recursos educacionais e o Laboratório Nacional de Referência para Tuberculose, reformado e modernizado, com nível de segurança biológica 3 e que atualmente está implantando um processo de gestão da qualidade. O Centro também é responsável pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica para Tuberculose Multirresistente.

O laboratório é encarregado da vigilância epidemiológica da tuberculose, instituída pelas Portarias Ministeriais Nº 409 e 410, de 12 de Setembro de 2002 e ratificada pela Portaria Ministerial Nº 2031, de 23 de Setembro de 2004, que estabelecem também, as competências dos diversos níveis de complexidade de atuação na rede de saúde pública.

Os métodos desenvolvidos no LRN foram padronizados por meio das rotinas dos laboratórios de referência mundial com tradição no diagnóstico da tuberculose, como o Instituto Pasteur de Paris, que foi o berço centenário da bacteriologia da tuberculose e da altíssima decodificação do DNA de *M. tuberculosis*, assim como o *Centers for Disease Control and Prevention*, em Atlanta (USA), que trouxe grandes conhecimentos propiciando maior cientificidade ao estudo laboratorial de uma doença que em nosso país na maioria das vezes é diagnosticada por um método tão simples como a baciloscopia do escarro. A instituição disponibilizou suas instalações para sediar a pesquisa e realizar os exames previstos no projeto,

bem como o material de consumo que fazem parte das várias técnicas utilizadas pelo laboratório.

Pela Portaria Ministerial Nº 70/GM, de 23 de Dezembro de 2004, foram estabelecidos critérios para habilitação de laboratórios que se propõe a referenciar sua rede de abrangência, e o LRN foi pré-selecionado para tal. Para atender às normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde e à demanda da Sociedade Organizada/Globalizada, houve uma busca pela qualidade por meio da habilitação do laboratório pelas NBR ISO/IEC 17025, que ocorreu em 09 de maio de 2008, após auditoria do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

Com a implantação, em 2007, do LRN em novas dependências, segundo o padrão de biossegurança NB3, deu-se um passo decisivo para servir como um novo paradigma para a rede laboratorial de segurança pública, preocupada com a observação das normas de segurança humana e ambiental em seus mais amplos aspectos.

O Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose do CRPFH (LRN) manipula diversas micobactérias (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) classificadas como CLASSE III, segundo a resolução Nº 1 de 1988 do Conselho Nacional de Saúde, capítulo X, artigo 64 e pela resolução normativa Nº 2 de 2006, quando trata da classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados e que também serve como guia para orientação nas medidas de biossegurança para a sua manipulação (BRASIL, 2006).

Faz parte do escopo da rotina do CRPHF a realização de exames como baciloscopia e cultura de amostras clínicas do ambulatório de pesquisa de tuberculose MDR, identificação de espécie e teste de sensibilidade por meio de várias técnicas de diagnósticos, realizados a partir de culturas positivas enviadas pelos laboratórios de saúde pública - Lacens e outros laboratórios (BRASIL, 2005).

5.2 Desenho do estudo

O delineamento utilizado neste projeto foi de um Estudo Descritivo e Analítico de cepas de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a rifampicina e isoniazida.

5.3 População do estudo

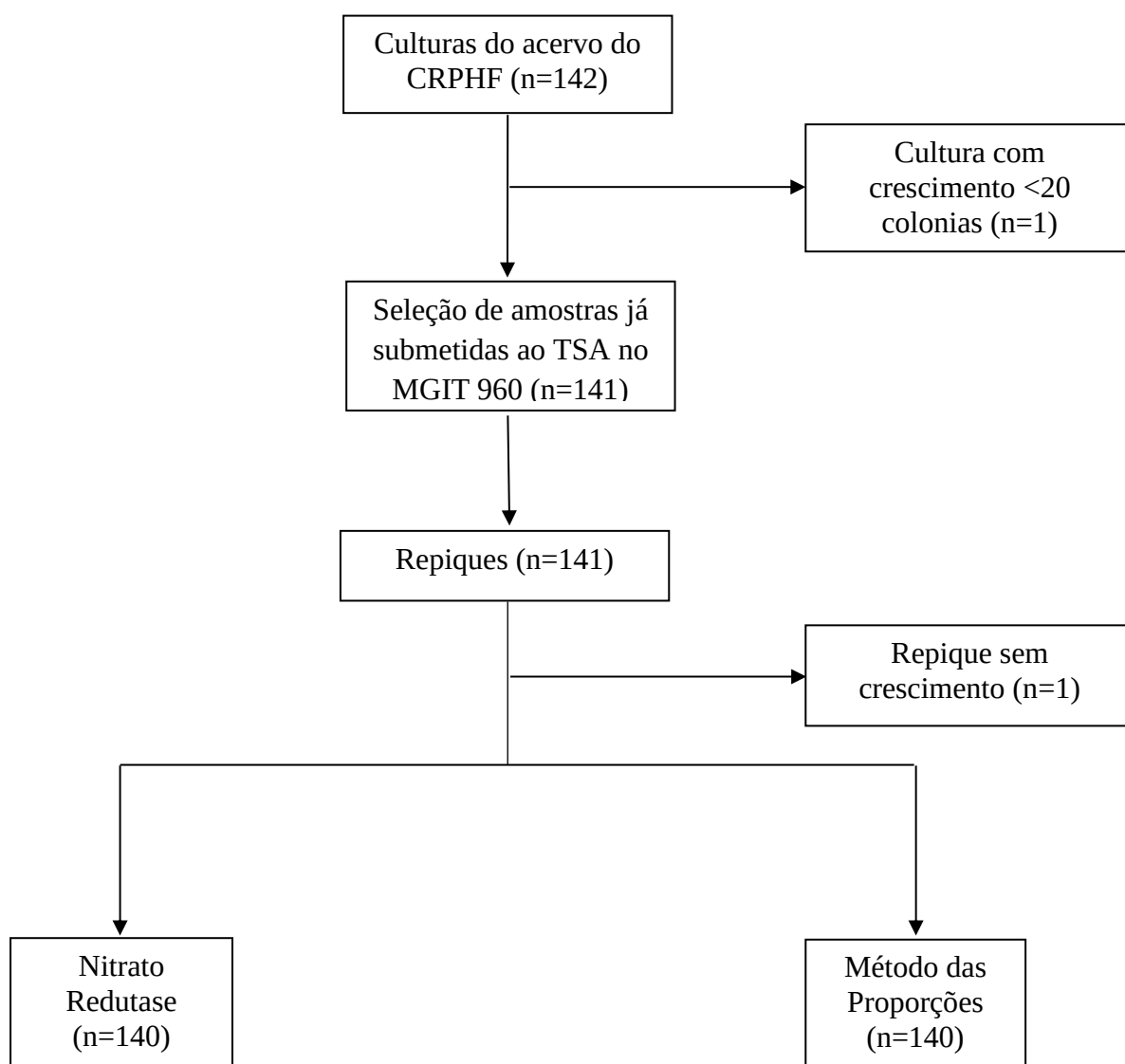
Cepas armazenadas no laboratório do CRPHF/ENSP ano de 2015, de pacientes atendidos no ambulatório de pesquisa com solicitação de teste de sensibilidade e cepas

encaminhadas por laboratórios de saúde pública, do ano de 2016, ao CRPHF, para realizar testes de diagnóstico.

5.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos todos os isolados de pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no ambulatório de pesquisa do CRPHF no ano de 2015, com pedido de teste de sensibilidade e 40 isolados de culturas encaminhadas para fazer teste de diagnóstico para as drogas de primeira linha S, I, R, E, do ano de 2016.

Foram excluídas culturas de pacientes com crescimento menor que vinte colônias para testes de diagnóstico ou de culturas que não cresceram após o repique. Desta forma a seleção de amostras para este estudo estão descritas no fluxograma abaixo:



5.4 Considerações sobre os aspectos éticos

O projeto de pesquisa de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Saúde Pública Sergio Arouca – ENSP, da Fundação Osvaldo Cruz, conforme **CARTA-CIRCULAR Nº 004/2016 – CEP/ENSP** de 18 de abril de 2016, esclarece sobre pesquisas que não necessitam de análise do Sistema CEP-CONEP. Foi solicitado à Direção do Centro de Referência Professor Hélio Fraga um documento autorizando o acesso e a aquisição das cepas estocadas, que pertencem ao acervo do Laboratório de Referência Nacional de Bacteriologia da Tuberculose e outras Micobacterioses Ângela Werneck, que se encontram em anexo.

A pesquisa usou o material de isolados de pacientes que tratam de tuberculose pulmonar resistente e multirresistente, e que fazem o acompanhamento no ambulatório de pesquisa do Centro de Referência Professor Hélio Fraga e de culturas de *M. tuberculosis* enviadas pelos LACENS para realizar teste de diagnóstico. Os dados clínicos, assim como a identidade dos pacientes envolvidos nesse estudo, foram completamente preservados.

Não foi necessária a elaboração de um termo de Consentimento Livre e Esclarecido porque foram utilizados dados secundários. Os nomes dos pacientes e os respectivos endereços foram mantidos em sigilo pelo pesquisador e não foram reconhecidos na maneira de apresentação do trabalho através de mapas, logradouros.

5.5 Materiais e métodos

5.5.1 Testes no método nitrato redutase

Foram 102 isolados de cultura de escarro obtidos de pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no ambulatório de pesquisa com solicitação de teste de sensibilidade do ano de 2015 e 40 isolados de *M. tuberculosis* de 184 amostras do mês de agosto de 2016, encaminhadas ao laboratório do CRPHF pelas instituições: HMRPS, Policlínica de Bangu, Lacen do Maranhão e Lacen da Paraíba para realização de testes de sensibilidade de diagnóstico para os fármacos de primeira linha com o intuito de se confirmar a sensibilidade ou a resistência à rifampicina e isoniazida.

O perfil de sensibilidade das cepas foi o seguinte: 48 cepas sensíveis a RMP e INH, 66 cepas MR e 26 cepas com resistência à RMP ou INH. Duas cepas foram retiradas do estudo, sendo que uma cepa não houve crescimento após repique e a outra cepa, o isolado de cultura tinha um número menor do que 20 colônias (primeiro TS do paciente), considerando que não é

recomendada realização do TS das culturas em que o número de colônias é menor que 20, pois essa amostra pode não ser representativa da população bacilar na lesão.

As cepas padrão H37Ra (American Type Culture Collection - ATCC) e 9096 (cepa de Proficiência Round 13) serviram como cepas controle de nitrato negativo e positivo respectivamente nos testes de sensibilidade, para controle de qualidade. Cepas sensíveis e resistentes conhecidas foram usadas nesse estudo e confirmadas como *M. tuberculosis*, baseadas em seu tempo de crescimento, pigmentação, morfologia de colônia, sensibilidade ao ácido-*p*-nitrobenzóico (PNB)(realizado juntamente com os testes no MP) e o teste imunoensaio cromatográfico rápido MPT64 que também foi realizado com os testes do MGIT 960. Todas as cepas foram cultivadas em meio Löwenstein-Jensen (LJ) para realizar o teste de nitrato redutase e método das proporções.

Os testes de nitrato redutase foram preparados a partir da pesagem de três bases de 200 mL de meio de cultura LJ com 1 mg/mL de NaNO₃. Cada uma das bases com uma concentração final de 1 mg/mL foi esterilizada a 121° C por 15 minutos. Os fármacos rifampicina e isoniazida foram preparadas conforme o quadro abaixo e incorporadas ao meio de cultura. Volumes de 7 mL foram distribuídos em tubos de vidro com tampa de rosca identificados com os fármacos, e os tubos controle sem fármacos. Os tubos foram coagulados de 80° a 85° C por 45 minutos. O volume do meio com fármacos foi preparado de acordo com o número de testes da rotina.

Preparo dos fármacos:

Quadro 3 – Preparo da solução e diluições do fármaco INH

INH		
pesar 100 mg	10 mL H ₂ O	estoque
1 mL (estoque)	9 mL H ₂ O	(1)
1 mL (1)	9 mL H ₂ O	(2)
0,4 mL (2)	200 mL LJ	0,2 µg/mL

Quadro 4 - Preparo da solução do fármaco RMP

RMP		
pesar 100 mg	10 mL etileno glicol	estoque
0,8 mL (estoque)	200 mL LJ	40 µg/mL

Cada fármaco foi preparado numa concentração de 10 mg/mL em H₂O destilada estéril, exceto a rifampicina que foi dissolvida em etileno glicol. Soluções estoque podem ser armazenadas a -20° C por não mais que 4 meses. O meio LJ convencional com drogas foi preparado tal como descrito em Canetti et al., (1963). O meio para o teste de nitrato redutase foi preparado com uma ligeira modificação: 1 mg/mL de NaNO₃, e foi adicionado ao meio LJ com e sem antibióticos, e coagulado durante 50 minutos a 80° C.

O teste de nitrato redutase foi realizado de acordo com o método descrito por Angeby et al., 2002 e método das proporções: a partir de um crescimento em meio sólido de culturas frescas (21-28 dias) uma quantidade de massa bacteriológica foi transferida com alça descartável estéril para um tubo de ensaio com pérolas de vidro e 0,5 mL de água destilada estéril. A solução foi homogeneizada em agitador mecânico por 20 a 30 segundos e mantida em repouso por 10 minutos. Acrescentou-se aproximadamente 2 mL de água destilada estéril, agitou-se novamente e o tubo ficou em repouso por mais 10 minutos para sedimentar as partículas maiores.

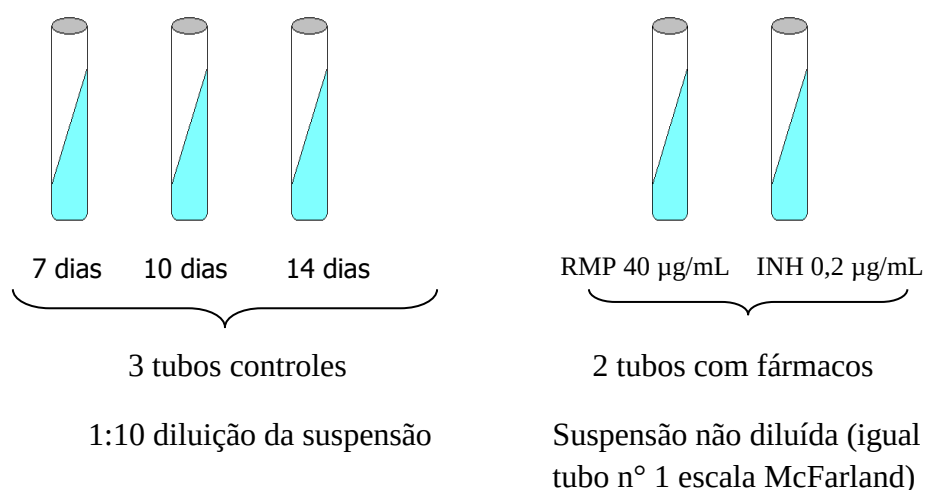
Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, gotejou-se lentamente a suspensão em um tubo contendo 3 mL de água destilada estéril até se obter a turvação correspondente ao tubo número 1 da escala de MacFarland. A partir dessa suspensão foi feita uma diluição de 1:10 em água destilada. De cada isolado foram semeados 0,2 mL do inóculo não diluído nos tubos contendo o meio LJ com NaNO₃ e os fármacos RMP e INH. Em cada um dos três tubos controles de meio LJ contendo NaNO₃ e livres de fármacos foram semeados 0,2 mL da diluição 1:10. Os tubos foram incubados a 37°C durante 14 dias.

Na leitura de sete dias adicionar 0,5 mL do reagente de revelação a um dos tubos controle. Quando aparecer a coloração rosa claro a rosa intenso, adicionar o reagente de revelação nos tubos com fármacos. Quando não ocorrer a mudança de cor, esse tubo é descartado e reincubado os tubos restantes. Quando necessário, este procedimento será repetido no dia 10 usando o segundo tubo controle; não havendo viragem no dia 7 ou no dia 10, o mesmo procedimento será repetido no dia 14 usando o terceiro tubo controle. Uma cepa é considerada resistente quando a mudança de cor no tubo com fármaco (cor rosa) for mais forte ou igual a do tubo controle.

Os reagentes de revelação dos testes foram preparados adicionando 50 mL de ácido clorídrico e 50 mL de H₂O estéril (vol/vol) denominada de solução A, pesado e adicionado 0,2 g de sulfanilamida em 100 mL de H₂O estéril que é a solução B, pesado 0,1 g de n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride e adicionado em 100 mL de H₂O estéril que é a solução C. A solução de trabalho foi preparada a partir das soluções de revelação conforme se

segue: 1 parte da solução A + 2 partes da solução B + 2 partes da solução C. O volume da solução de trabalho foi preparada de acordo com o número de tubos controles dos testes realizados. Os reagentes de Griess foram preparados em pequenos volumes e misturados pouco antes da utilização.

Figura 1: Kit - teste NRA



5.5.2 Teste no método das proporções

A partir de um crescimento em meio sólido, uma quantidade de massa bacteriológica foi transferida com alça bacteriológica descartável estéril de uma cultura para um tubo de ensaio com pérolas de vidro e 0,5 mL de água destilada estéril. A solução foi então homogeneizada em agitador mecânico por 20 a 30 segundos e mantida em repouso por 10 minutos. Foi acrescentado aproximadamente 2 mL de água destilada estéril, agitou-se novamente e o tubo ficou em repouso por mais 10 minutos para sedimentar as partículas maiores (BRASIL, 2005).

Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, gotejou-se lentamente a suspensão em um tubo contendo 3 mL de água destilada estéril até se obter a turvação correspondente ao tubo número 1 da escala de MacFarland. A partir dessa suspensão foram feitas diluições seriadas conforme a técnica padronizada por Cannetti, Rist e Grosset em 1963 (teste padrão).

Primeiramente foi adicionado 9 mL de água destilada estéril em cada um dos tubos. Depois, transferiu-se 1 mL da suspensão padrão para o tubo 10^{-1} , agitando-o no agitador mecânico e trocando-se a pipeta para prosseguir com as diluições, sendo transferindo 1 mL para o tubo 10^{-2} , e assim sucessivamente até o tubo 10^{-6} . As diluições 10^{-3} (1/1.000), 10^{-5} (1/100.000) e 10^{-6} (1/1.000.000) foram as diluições semeadas no meio LJ com e sem fármaco (BRASIL, 2005).

Foi então semeado 0,1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-5} em cada tubo de meio de cultura com fármaco e nos tubos controle sem fármaco e identificados e 0,1mL da diluição 10^{-6} em dois tubos controle de meio LJ também sem droga. Para cada diluição as pipetas foram trocadas, os tubos de meio de cultura semeados foram fechados sem rosquear a tampa até o fim e movimentando cada um desses tubos, de modo que o inóculo ficou semeado em toda a superfície do meio para facilitar o crescimento separado de colônias para a contagem. Os tubos inoculados foram colocados inclinados em bandeja de aço inox deixando o lado da tampa mais alto e com a superfície do meio que foi semeado voltada para cima. Incubou-se em estufa bacteriológica a $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 48 horas, depois as tampas foram fechadas por completo quando a semeadura já tinha sido absorvida. Caso o meio de cultura ainda permaneça úmido, mantém-se a tampa frouxa por mais 24 ou 48 horas. Em cada lote de meio testado foi feito um controle com a cepa ATCC H37Ra. Os testes ficaram incubados por um período de 28 dias, quando foi determinada a porcentagem de resistência através da contagem de colônias nos tubos controle e nos tubos teste. A limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado, foram realizados seguindo as normas de biossegurança e as boas práticas de laboratório (BRASIL, 2005).

5.5.3 Teste no método automatizado

O preparo dos meios de cultura para os testes de sensibilidade utilizados no sistema automatizado MGIT 960 foram executados de acordo com as instruções do fabricante, consistindo em preparar um dos tubos com o agente inibidor PNB (ácido *p*-nitrobenzóico) e quatro tubos com os fármacos SIRE (S=SM, I=INH, R=RMP e E=EMB). Assepticamente, adicionamos 0,8 mL de OADC em cada tubo de meio de cultura (um tubo para cada fármaco). Utilizando uma micropipeta automática, foram inoculados 100 μL de cada uma dos fármacos nos tubos BBL, identificados previamente; e no PNB, 168 μL da solução estoque em cada tubo do teste. Os testes de sensibilidade foram organizados da seguinte maneira: tubo controle, tubos SIRE e por último o tubo do PNB. O número do isolado bacteriano foi identificado em todos os tubos do teste. Limpeza e desinfecção da cabine de fluxo laminar foram feitas descartando o

material quando necessário, lembrando que estes procedimentos foram efetuados observando os cuidados de biossegurança com as boas práticas de laboratório e o uso de EPIs (BRASIL, 2005).

O teste de sensibilidade aos fármacos foi realizado a partir de isolados de *M. tuberculosis* em meio sólido. A partir desse crescimento foi transferido com alça bacteriológica descartável estéril quantidade suficiente de colônias de uma cultura para um tubo de ensaio com pérolas de vidro, e 0,5 mL de água destilada estéril. As colônias foram maceradas em agitador mecânico por 20 a 30 segundos e mantidas em repouso por 10 minutos. Foi acrescentado aproximadamente 2 mL de água destilada estéril, agitado novamente e deixado em repouso por mais 10 minutos para sedimentar as partículas maiores. Gotejou-se lentamente a suspensão em um tubo contendo 3 mL de água destilada estéril até que a turvação correspondente ao tubo número 1 da escala de MacFarland foi obtida (BRASIL, 2005).

Em um frasco estéril com tampa de rosca, com capacidade para 30 mL, foram distribuídos assepticamente 4 mL de água destilada estéril para fazer a diluição 1:5. Em outro frasco distribuímos 10 mL de água destilada estéril. Os frascos foram identificados com o número do isolado bacteriano do teste de sensibilidade. Com micropipeta automática, foi diluído 1 mL da suspensão que foi ajustada até a escala número 1 de MacFarland no tubo que continha 4 mL de água destilada estéril – suspensão 1:5. Com micropipeta automática foi diluída 0,1 mL da suspensão preparada (1:5) em 10 mL de água destilada estéril (1:100) (BRASIL, 2005).

Foi inoculado no tubo controle de crescimento com micropipeta automática 0,5 mL da suspensão 1:100. Com micropipeta automática foi inserido 0,5 mL da suspensão 1:5 em cada um dos tubos com meio de cultura contendo os fármacos estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e PNB. Os tubos foram rosqueados e dispostos nas estantes com código de barra e incubados no sistema BACTEC MGIT 960. Foi verificada diariamente a indicação de resultados finalizados no equipamento que forneceu os resultados de resistência ou sensibilidade aos fármacos de cada isolado bacteriano testado. Os resultados dos testes finalizados foram impressos. O tubo com PNB foi acompanhado juntamente com as leituras dos TS. Após a liberação dos resultados o PNB foi interpretado como negativo três dias após o término de todos os testes (BRASIL, 2005).

5.5.4 **Análise dos dados**

Os dados foram organizados e estruturados em planilhas eletrônicas no Microsoft Excel.

A análise estatística dos resultados referentes aos cálculos de sensibilidade, de especificidade, intervalo de confiança, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e concordância foram realizados no programa WIN EPISCOPE versão 2.0. (THRUSFIELD *et al.*, 2001).

Utilizamos a amostragem aleatória simples, do programa Handomize para o sorteio das amostras (URBANIK & PLOUS, 2013).

Tabelas de contingência foram utilizadas para comparar os resultados obtidos nas metodologias aplicadas ao estudo.

6 RESULTADOS

Numerosos métodos alternativos têm sido propostos para a detecção de tuberculose resistente a drogas. Neste trabalho, o NRA foi utilizado como um método alternativo indireto para a detecção rápida de resistência às drogas antituberculosas de primeira linha, rifampicina (RMP) e isoniazida (INH), em 140 isolados clínicos de *M. tuberculosis* sendo 100 cepas do CRPF do ano de 2015 e 40 cepas do ano de 2016. A análise da NRA foi feita por meio de comparação da coloração do tubo contendo antibiótico no meio L-J com NaNO₃ e o tubo controle, livre de antibiótico. Uma cepa é resistente se a mudança de cor no tubo com fármaco (cor rosa) for mais forte ou igual ao tubo controle.

Na análise da rifampicina (RMP), 76 e 59 cepas foram detectadas como resistentes e sensíveis respectivamente através da NRA quando comparadas aos resultados produzidos pelo MP, padrão ouro tradicional. Entretanto, cinco cepas apresentaram resultados discordantes entre estes métodos (NRA e MP). Na comparação dos resultados obtidos através da NRA para a rifampicina (RMP) e os resultados obtidos pelo Método MGIT 960, padrão ouro para testes em meio líquido, observamos que 75 e 59 cepas foram detectadas como resistentes e sensíveis respectivamente. Porém, um grupo de seis cepas apresentaram resultados discordantes entre os métodos. Estes dados encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2.

Na análise da isoniazida (INH), 82 e 57 cepas foram detectadas como resistentes e sensíveis respectivamente através da NRA e quando comparadas com os resultados produzidos pelo MP apenas uma cepa apresentou resultado discordante entre estes métodos (NRA e MP). Paralelamente, 79 e 52 cepas apresentaram resultados como resistentes e sensíveis respectivamente, quando comparadas com os resultados obtidos pelo Método MGIT 960. Entretanto, um grupo de nove cepas apresentou resultados discordantes entre estes métodos (NRA e MGIT). Os resultados obtidos na comparação entre o método NRA para isoniazida e os métodos tradicionais também podem ser visualizados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Resultados de NRA comparados com MP para 140 cepas de *M. tuberculosis*. CRPHF/2015-2016.

Fármaco	Sensibilidade para ambos os métodos	Resistência para ambos os métodos	Sensibilidade somente para NRA	Sensibilidade somente para MP	Percentual de Concordância
Rifampicina	59	76	4	1	92%
Isoniazida	57	82	1	-	98%

NRA, teste de nitrato redutase; MP, método das proporções.

FONTE: A autora

Tabela 2 – Resultados de NRA comparados com MGIT para 140 cepas de *M. tuberculosis*. CRPHF/2015-2016.

Fármaco	Sensibilidade para ambos os métodos	Resistência para ambos os métodos	Sensibilidade somente para NRA	Sensibilidade somente para MGIT	Percentual de Concordância
Rifampicina	59	75	4	2	91%
Isoniazida	52	79	5	4	87%

NRA, teste de nitrato redutase; BACTEC MGIT 960.

FONTE: A autora

Resultados práticos da metodologia NRA na avaliação para rifampicina e isoniazida, podem ser visualizados nas Fotografias 1, 2, 3 e 4.

Fotografia 1 - NRA mostrando sensibilidade a RMP e INH. Tubo A sem fármaco = positivo, tubo B = 02 mg INH e tubo C = 40 mg RMP = NRA negativo.



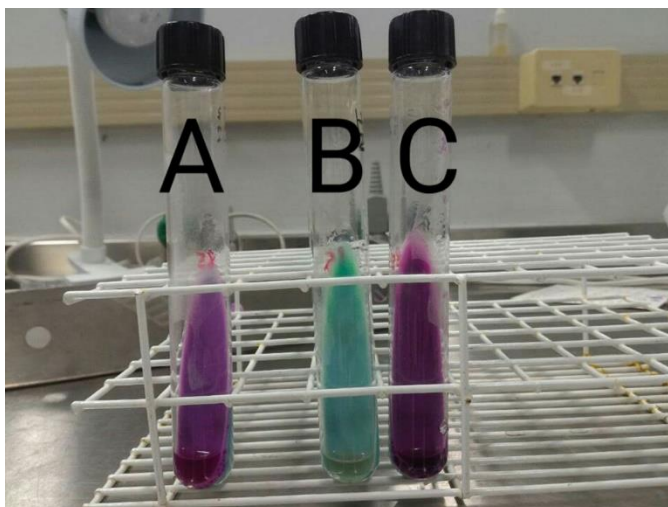
Fonte: A autora, 2015

Fotografia 2 - NRA mostrando resistência a RMP e INH. Tubo A sem fármaco = positivo, tubo B = 02 mg INH e tubo C = 40 mg RMP = NRA positivo.



Fonte: A autora, 2015

Fotografia 3 - NRA mostrando resistência só a RMP. Tubo A sem fármaco = positivo, tubo B = 02 mg INH = NRA negativo e e tubo C = 40 mg RMP = NRA positivo.



Fonte: A autora, 2015

Fotografia 4 - NRA mostrando resistência só a INH. Tubo A sem fármaco = positivo, tubo B = 02 mg INH = NRA positivo e tubo C = 40 mg RMP = NRA negativo.



Fonte: A autora, 2015

A sensibilidade (capacidade de detectar a resistência verdadeira), a especificidade (capacidade de detectar a sensibilidade verdadeira) e a acurácia foram avaliadas quando comparamos os resultados dos testes de NRA com os resultados das análises dos mesmos isolados pelos métodos MP e MGIT 960.

A sensibilidade e a especificidade de NRA para a RMP comparadas ao MP foram de 95% e 98%; e no MGIT 960, 95% e 97%; com Intervalo de Confiança de 95%, RMP-MP (90,2 - 99,7 e 95 - 100) e RMP-MGIT 960 (90,1 - 99,7 e 92,2 - 100) respectivamente (Tabela 3).

A sensibilidade e a especificidade obtidas para INH comparadas ao MP foram de 99 % e 100%; no MGIT foi de 94% e 95%; com Intervalo de Confiança de 95% para INH-MP (96,4 - 100 e 100-100) INH-MGIT 960 (88,9 - 99,1 e 86,1 - 99,6) respectivamente (Tabela 4).

Os valores preditivo positivo e os valores preditivo negativo para a RMP no MP foi de 99% e 94%, e no MGIT foi de 97% e 94%, os valores preditivo positivo e valores preditivo negativo para a INH no MP foi de 100% e 98% e no MGIT 960 foi de 95% e 91%. A acurácia para a RMP foi de 98% no MP, e 87% no MGIT 960. A acurácia para a INH no MP foi de 98% e no MGIT 960, 96% (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 – Resultados da acurácia e IC (entre parênteses) de NRA aos fármacos RMP e INH em comparação com MP para 140 cepas de *M. tuberculosis*. CRPHF/2015-2016.

Fármaco	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Rifampicina	95(90,2-99,7)	98,3(95-100)	98,7(96,1-100)	93,6(87,6-99,6)
Isoniazida	98,7(96,4-100)	100(100-100)	100(100-100)	98,2(94,9-100)

NRA, teste de nitrato redutase; MP, método das proporções; RMP, Rifampicina; INH, Isoniazida; IC, Intervalo de Confiança.

FONTE: A autora

Tabela 4 – Resultados da acurácia e IC (entre parênteses) de NRA aos fármacos RMP e INH em comparação com MGIT 960 para 140 cepas de *M. tuberculosis*. CRPHF/2015-2016.

Fármaco	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Rifampicina	94,9(90,1-99,7)	96,7(92,2-100)	97,4(93,8-100)	93,6(87,6-99)
Isoniazida	94(88,9-99,1)	92,8(86,1-99,6)	95,1(90,5-99,7)	91,2(83,8-98,5)

NRA, teste de nitrato redutase; BACTEC MGIT 960; RMP, Rifampicina; INH, Isoniazida; IC, Intervalo de Confiança.

FONTE: A autora

Para a RMP os testes de NRA, quando comparados ao MP, gerou um resultado falso positivo, que concordou com o resultado do MGIT 960. Os testes de NRA para a RMP gerou quatro resultados falso negativos quando comparados com MP, sendo que três desses

resultados concordaram com os resultados gerados pelo MGIT 960 e um resultado foi discordante nas duas metodologias padrão (MP e MGIT 960).

Quando comparada com o MGIT 960, o teste de NRA para a RMP gerou dois resultados falso positivos que concordaram com os resultados gerados pelo MP. Os testes de NRA para a RMP gerou quatro resultados falso negativos quando comparados com os resultados gerados pelo MGIT 960. No entanto esses quatro resultados concordaram com os resultados gerados pelo MP.

Os testes de NRA para a INH, gereou um resultado falso negativo quando comparado com as duas metodologias padrão MP e MGIT 960. Os testes de NRA para a INH teve 100% de concordância nos resultados verdadeiros positivos (resistentes) quando comparados com as duas metodologias padrão MP e MGIT 960.

Os testes de NRA para a INH, gerou cinco resultados falso negativos, quatro desses resultados concordaram com o MP. O resultado de uma amostra concordou com as duas metodologias padrão MP e MGIT 960, porém discordou de NRA. Ainda nos resultados dos testes de NRA para a INH, foi gerado quatro resultados falso positivos quando comparado aos testes do MGIT 960, mas esses mesmos resultados dos testes de NRA concordaram com os resultados do MP. Esses dados podem ser observados nos Quadros 5, 6, 7 e 8.

Quadro 5 - Resultados de Rifampicina (RMP)-NRA comparados com MP para 140 cepas de *M. tuberculosis*.

		MP	
		R	S
NITRATASE	R	73	1
	S	4	59

Sensibilidade	95,000
Especificidade	98,333
VPP	98,701
VPN	93,651
Concordância	0,928

kappa

Quadro 6 - Resultados de Rifampicina (RMP)-NRA comparados com MGIT 960 para 140 cepas de *M. tuberculosis*.

		MGIT	
		R	S
NITRATASE	R	75	2
	S	4	59

Sensibilidade	94,937
Especificidade	96,721
VPP	97,403
VPN	93,5651
Concordância	0,913

kappa

Quadro 7 - Resultados de Isoniazida (INH)-NRA comparados com MP para 140 cepas de *M. tuberculosis*.

		MP	
		R	S
NITRATASE	R	82	0
	S	1	57

Sensibilidade	98,795
Especificidade	100,000
VPP	100,000
VPN	98,276
Concordância	0,985

kappa

Quadro 8 - Resultados de Isoniazida (INH)-NRA comparados com MGIT 960 para 140 cepas de *M. tuberculosis*.

		MGIT	
		R	S
NITRATASE	R	79	4
	S	5	52

Sensibilidade	94,048
Especificidade	92,857
VPP	95,181
VPN	91,228
Concordância	0,866

kappa

Em relação aos testes produzidos pela NRA resultados confiáveis dos 140 testes realizados foram liberados em 7, 10 e 14 dias (Quadro 9). Foram feitas avaliações dos testes liberados entre 7 e 10 dias que resultaram em 118 testes e em 14 dias a liberação dos resultados de 22 testes. Das 48 cepas sensíveis, 37 produziram resultados com 7 dias e 11 cepas produziram resultados com 10 dias. Das 66 cepas MR, 23 cepas produziram resultados com 7 dias; 34 cepas produziram resultados com 10 dias; e 9 cepas liberaram testes com 14 dias.

Quadro 9 – Tempo de liberação dos testes de NRA.

Nº de testes liberados	Tempo		
	7 dias	10 dias	14 dias
140	66(47%)	52(37,1%)	22(15,7%)
48 Sensíveis	37(77%)	11(22,9%)	-
66 MR	23(34,8%)	34(51,5%)	9(13,6%)

NRA, teste da nitrato redutase; MR, multirresistente.

FONTE: A autora

Dos 140 testes indiretos realizados no sistema automatizado MGIT 960, 117 testes foram liberados ente 5 e 10 dias. Os outros 23 testes foram liberados com até 12 dias. Das 48 cepas sensíveis, 17 produziram resultados com 7 dias, 23 cepas com 10 dias e 8 cepas com 12 dias. Dos 66 testes resistentes a rifampicina e isoniazida – MR, o sistema MGIT 960 liberou 18

resultados com até sete dias; com até dez dias, 40 testes; e 8 testes com até doze dias (Quadro 10).

Quadro 10 – Tempo de liberação dos testes de MGIT 960.

Nº de testes liberados	Tempo		
	7 dias	10 dias	12 dias
140	23(16,4%)	94(67,1%)	23(16,4%)
48 Sensíveis	17(35,4%)	23(47,9%)	8(16,6%)
66 MR	18(27,2%)	40(60,6%)	8(12,1%)

BACTEC MGIT 960; MR, multirresistente.

FONTE: A autora

Os custos prontamente mensuráveis do MGIT 960, incluindo meios de cultura, enriquecimento e antibióticos, excedem os custos da NRA, que também inclui os meios de cultura, substrato, antibióticos e reagentes. A comparação desses custos, com base em 140 testes analisados, está descrito no Quadro 11.

Quadro 11 – Despesas de custeio de NRA versus MGIT 960 no ano de 2015.

NRA	Valor Estimado do Teste em R\$	MGIT 960	Valor Estimado do Teste em R\$
LJ	0,78	Tubo BBL	44,00 (3 tubos = 132,00)
Ovo	0,33	KIT SIRE	3.520,00 (R+I = 44,00)
RMP	0,09	-	-
INH	(0,000016)	-	-
NaNO ₃	(0,001225)	-	-
HCl	0,02	-	-
sulfanilamida	(0,00225)	-	-
naftiletilenodiamine	0,05	-	-
1 teste de NRA	1,27	1 teste de MGIT 960	176,00
140 testes NRA	177,80	140 testes MGIT	2.640,00

NRA, teste da nitrato redutase; BACTEC MGIT 960; L-J, Lowenstein-Jensen; R, rifampicina; I, isoniazida; NaNO₃, nitrato de sódio; HCl, ácido clorídrico; BBL, tubo com meio de cultivo líquido; OADC, ácido oleico, albumina, dextrose e catalase.

FONTE: A autora

7 DISCUSSÃO

A tendência mais preocupante durante os últimos anos é um aumento em estirpes de tuberculose multirresistente, isto é, resistente à rifampicina e isoniazida. A detecção rápida de estirpes de MDR é muito importante para restringir a sua propagação na população. Os métodos atuais para testes de susceptibilidade às drogas são caros ou muito lentos. Assim, um método de teste de sensibilidade às drogas rápido, econômico e eficaz se faz necessário.

No presente estudo, o NRA provou que é altamente sensível e específico para a detecção rápida de resistência à isoniazida e rifampicina. Conforme o resultado, cada paciente pode ser tratado precocemente com terapia padrão e as complicações e os custos com a saúde podem ser reduzidos.

Cepas de nitrato redutase negativa de *M. tuberculosis* não foram encontradas nesse estudo e como a detecção de MNTs positivas para nitrato redutase não pode ser excluída, além do PNB o teste TB Ag MPT64 imunoensaio cromatográfico rápido foi usado em nosso estudo para identificação qualitativa do complexo *M. tuberculosis*.

Resultados da meta-análise de Martin *et al.*, (2008), avaliou que a maioria dos estudos sobre o método NRA tinha uma sensibilidade de 95% ou mais para rifampicina (RMP) e isoniazida (INH), quase todos com 100% de especificidade e com acurácia elevada (MARTIN *et al.*, 2008).

Fonseca *et al.*, (2012), usando a metodologia de teste indireto comparou os testes de NRA com MP e MGIT, com valores de κ de 0,99 e 1 para RMP e comparou também os testes de NRA com MP e MGIT, com os valores de κ de 0,94 e 0,93 para INH e encontrou uma excelente concordância entre os dois métodos.

Shikama *et al.*, (2009) declarou 100% de sensibilidade e especificidade de NRA direto para RMP quando comparou com os resultados do MP. Em outro estudo Shikama *et al.*, usando metodologias direta e indireta, mostrou concordância de 95% entre NRA-MP e NRA-MGIT 960 para isoniazida e rifampicina, dois dos mais poderosos medicamentos contra a tuberculose.

Rosales *et al.*, (2011) mostrou concordância total entre a NRA direta e MP indireto e classificou como muito boa. Para as drogas testadas, RMP e INH, o coeficiente de κ foi maior que 0,81. Na escala de concordância do Valor de Kappa para a avaliação de testes de diagnóstico classifica de concordância ótima κ de 0,81-0,99 (UFG, módulo 2).

Nesse mesmo estudo, Rosales *et al.*, (2011) sequenciou as cepas discordantes: uma INH falso resistente e uma RMP falso sensível, geradas pelo teste de NRA. Nenhuma mutação na região reguladora do gene KatG ou no gene *inhA* foi encontrada no isolado falso resistente à

INH. Embora a inexistência destas mutações não prove a sensibilidade, esse achado reforça a sua classificação como INH sensível. Não pode ser feito o sequenciamento no resultado falso sensível a RMP. Em um dos isolados encontrados como TB-MDR usando o teste de NRA não foi possível interpretar o resultado do teste no MP devido ao crescimento insuficiente. Foi feito sequenciamento da cepa e a análise detectou mutações no gen *rpoB* (Ser531Phe) e *katG* (Ser 315 Thr). Este isolado foi confirmado e considerado como TB-MDR e incluído nos resultados de NRA (ROSALES et al., 2011).

No presente estudo, observou-se uma excelente concordância entre os resultados de NRA e MP com os valores de κ de 0,92, 0,97 para RIF e INH, respectivamente. A sensibilidade de NRA para RIF e INH era de 95% e 99%, respectivamente; enquanto a especificidade foi de 98% para RMP e 100% para INH. Nosso estudo mostrou valores altos de sensibilidade e especificidade para isoniazida e rifampicina, que são os medicamentos mais importantes para o tratamento da tuberculose, comparando com outros estudos.

Os resultados de NRA e MGIT 960 para os valores de κ foram de 0,91 e 0,86 para RMP e INH, respectivamente. A sensibilidade de NRA para RMP e INH eram de 95% e 92% respectivamente, enquanto a especificidade foi de 97% para RMP e 93% para INH. As análises também indicaram acordo substancial entre os resultados dos testes de NRA e MGIT 960 para todos os medicamentos anti-tuberculose estudados. Os resultados encontrados em nosso estudo foram semelhantes aos relatados por outros trabalhos.

Os resultados falso-sensíveis obtidos no presente estudo utilizando o teste de NRA podem ser devido a estirpes borderline, com uma baixa proporção de organismos resistentes aos medicamentos na população de teste, que, embora demonstrando serem resistentes pelos testes MP e MGIT, não cresceram suficientemente para reduzir o nitrato no método NRA.

Quanto aos resultados dos testes de RMP e INH, produzidos como falsos positivos pela NRA, caberia uma pesquisa mais aprofundada, como a realização do teste de sequenciamento ou uma PCR dessas amostras para a verificação real dos resultados desses testes. Acreditamos também que essas limitações possam estar relacionadas especificamente com essas cepas em suas interações meio-droga com NaNO_3 , ainda desconhecida.

Também é importante ressaltar que o TS de NRA quando comparado com MP para RMP, gerou cinco resultados discordantes. Quatro foram reproduzidos pelo teste padrão MGIT 960 (NRA=MGIT 960). Um resultado não foi reproduzido ou seja o TS de NRA foi discordante nas duas metodologias MP e MGIT 960 (NRA $\neq$).

O TS de NRA quando comparado com o MGIT 960 para a RMP gerou seis resultados discordantes. Cinco foram reproduzidos pelo teste padrão MP, (NRA=MP). Um resultado não

foi reproduzido ou seja o TS de NRA foi discordante nas duas metodologias MP e MGIT 960 ($NRA \neq$).

Quando comparamos o TS de NRA com o MP para a INH foi gerado um resultado discordante que não foi reproduzido pelos testes padrão MP e MGIT 960 ($NRA \neq$). O TS de NRA quando comparado com o teste padrão MGIT 960 para a INH gerou nove resultados discordantes. Oito foram reproduzidos pelo teste padrão MP ($NRA = MP$). Um resultado não foi reproduzido ou seja o TS de NRA foi discordante nas duas metodologias MP e MGIT 960 ($NRA \neq$).

Não se pode esquecer que a clínica médica é importante e que o processo da decisão clínica para o tratamento da tuberculose baseia-se na probabilidade de a pessoa estar ou não doente. A suspeita do agravo é baseada na história clínica, na prevalência da doença na região, ou em outros tipos de exames.

A resistência a RMP é sempre associada com MDR e pode servir como um marcador de estirpes de *M. tuberculosis*, se os recursos forem limitados nos laboratórios de saúde pública. Um teste alternativo rápido para detectar a resistência a rifampicina e isoniazida teria melhores resultados do que os testes para detectar resistência à rifampicina sozinho. A detecção da resistência à isoniazida isolada já proporciona o início de um tratamento eficaz antes que o paciente desenvolva a resistência à rifampicina.

A sensibilidade e a especificidade obtida nos resultados deste estudo geraram ótima concordância entre os resultados de NRA comparados aos resultados do MP e MGIT 960 para a RMP e INH, o que é muito importante e indica o potencial deste ensaio simples e de baixo custo. A maior vantagem da NRA é que ela é realizada no meio LJ clássico que os laboratórios usam rotineiramente para o diagnóstico da TB, o que torna este método ser facilmente implementado em laboratórios de rotina. Nenhum equipamento caro é necessário para executar a NRA, facilitando a sua aplicação generalizada.

O tempo de resposta de um teste é importante para o paciente receber um tratamento adequado. O impacto de uma nova técnica não se baseia apenas no tempo para se obter resultados: o tempo total da resposta de um teste é uma combinação de procedimentos técnicos e devemos considerar que atrasos operacionais podem ser encontrados em sistemas de serviços de saúde.

Dos 140 testes indiretos de NRA foram liberados 84,2%, ou seja, a maioria, entre sete e dez dias, e os resultados de 15,7% deram leitura com 14 dias. Os resultados dos 48 testes das cepas sensíveis à RMP e INH (77% das amostras), foram liberados com sete dias, enquanto os testes restantes (22,9%) deram leitura com dez dias, ou seja, os testes das cepas totalmente

sensíveis foram significativamente mais propensos a liberar seus resultados num tempo menor do que as cepas com qualquer resistência. Os resultados dos 66 testes MR - resistentes a RMP e INH (34,8%) foram liberados com sete dias; 51,5% com dez dias; e 13,6% com quatorze dias.

Dos 140 testes indiretos realizados no sistema automatizado MGIT 960, 83,5% dos testes foram liberados entre 5 e 10 dias; 16,4% foram liberados com até 12 dias. Os testes de 48 cepas sensíveis foram liberados como se segue: 35,4% com até 7 dias, 47,9% com até 10 dias e 16,6% com até doze dias. Dos 66 testes resistentes a rifampicina e isoniazida – MR, o sistema MGIT 960 liberou 27,2% dos resultados com até sete dias; 60,6% com até dez dias; e 12,1 % com até doze dias.

Nos dados acima pode-se observar a semelhança quando os testes das cepas MR feito com as duas metodologias NRA e MGIT 960 produziram um número maior de resultados com dez dias de incubados. O tempo dos resultados obtidos com a NRA são semelhantes ao tempo dos resultados obtidos com o sistema MGIT 960, ou seja, uma média de 10 dias, e estão disponíveis em um tempo muito menor do que os 28 dias necessários para o MP. Esses resultados mostraram que o teste de nitrato redutase é uma ferramenta valiosa para a detecção rápida da sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas antituberculose e muito útil para a detecção precoce da resistência aos medicamentos.

Nessa época de contenção de custos é importante incorporar a sensibilidade e a especificidade ao avaliar novas metodologias de diagnósticos. Os testes de NRA utilizados no presente estudo foram produzidos pelo Setor de Meios de Cultura e Reagentes do Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose do CRPHF. Um teste de NRA, produzido com antibióticos, meio de cultura e reagentes de marcas conhecidas e confiáveis tem um valor estimado de R\$ 1,27. O custo total dos 140 testes realizados pela técnica de NRA foram estimados em R\$ 177,80. A avaliação do custo de um (01) teste foi feita levando em consideração o volume do meio L-J com o substrato NaNO₃ e com a incorporação dos antibióticos RMP e INH nas concentrações de 40ug/mL e 0,2ug/mL.

Os insumos utilizados no sistema MGIT 960 são apresentados e adquiridos em forma de KITs e a avaliação do custo de um teste foi estimada em R\$ 177,80. A cada tubo BBL com meio líquido, bem como cada insumo que compõem o kit-test, foi acrescido um valor individual de acordo com o volume indicado pelo fabricante. O custo total dos 140 testes realizados pelo MGIT 960 foram estimados em R\$ 2.640,00.

Comparando o valor total dos 140 testes de NRA a R\$ 177,80 e o valor dos mesmos testes no sistema MGIT 960 no valor de R\$ 2.640,00 podemos afirmar que os testes no MGIT

960 foram aproximadamente 138 vezes mais caros do que os 140 testes feitos pelo método NRA.

Vale ressaltar que avaliar custos requer a consideração de muitos fatores além do mero custo de reagentes, meios de cultura e antibióticos. O trabalho técnico, calibração e controles de qualidade, repetição de resultados, todos os itens consumíveis menores (luvas, aventais descartáveis, pipetas e ponteiros, sacos de lixo de risco biológico), e outros suprimentos comuns de microbiologia e despesas gerais do laboratório não estão inclusos na avaliação feita para cada custo desses testes.

Testes com custos unitários mais elevados podem levar a menores despesas médicas quando a precisão do diagnóstico e velocidade são melhoradas. As vantagens e limitações de cada método de diagnóstico de TB disponível são evidentes e não há ainda nenhum teste disponível que atenda de modo geral toda a especificação do alvo a ser atingido. Além disso, a qualidade dos resultados dos testes com os métodos existentes são dependentes da disponibilidade de recursos humanos e financeiros suficientes, a formação do pessoal de laboratório e monitoramento de desempenho. Novos métodos que ultrapassem as limitações com respostas aos desafios colocados pelas populações especiais será bem recebido.

8 CONCLUSÃO

Um dos principais desafios para a comunidade de saúde pública atualmente é ser capaz de diagnosticar efetivamente pacientes com tuberculose multirresistente (TB-MDR). A prioridade mais importante para o controle da tuberculose é o diagnóstico precoce, rápido e preciso para o tratamento imediato das pessoas com tuberculose. Nesse contexto, o teste de NRA provou ser uma alternativa interessante por ser sensível, específico, economicamente viável, além de ser rápido no diagnóstico de TB- MDR. É importante enfatizar que o compromisso político é fundamental para garantir o financiamento de novas técnicas de diagnóstico, bem como na melhoria à adaptação de técnicas laboratoriais adequadas.

A escolha do teste de diagnóstico em meio sólido deve ser considerada porque os sistemas que utilizam o meio líquido apresentam alto custo e a disponibilidade de materiais de consumo dificultam a manutenção de estoques, além de ser mais propenso a contaminação. O meio L-J está disponível universalmente, seu custo global e a disponibilidade, portanto, têm implicações importantes na decisão pelo método de escolha do teste de sensibilidade às drogas em um país.

REFERÊNCIAS

- ÄNGEBY K.A., *et al.* Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p.553-555, 2002.
- BATES J.H, STEAD W.W. The history of tuberculosis as a global epidemic. **Medical Clinics of North America**. v.77, n.6, p.1205-1217, Nov, 1993.
- BECTON & DICKINSON - Diagnostic Systems: BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube Products. 1994. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Patient. Procedure Manual for Bactec TM MGIT TB System.
- BECTON & DICKINSON - Mycobacteria Growth Indicator Tube Culture and Drug Susceptibility Demonstration Project. Prepared for The Foundation for Innovation New Diagnostics, 2006. Procedure Manual for Bactec TM MGIT TB System.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. Brasília, Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 7ª. Edição. Rio de Janeiro: EAD\ENSP, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro. 2002, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2004.

BRASIL. Portaria nº 2031/GM de 23 de setembro de 2004, sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. 2004.

BRASIL. Portaria nº 70/GM de 23 de dezembro de 2004 que estabelece os critérios e a sistemática para a habilitação de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Regional para as Redes Nacionais de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde. **Diário Oficial da União**, pg 54, de 24 de fevereiro de 2005, seção 1.

CANETTI G. F. W., *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity tests in tuberculosis control programs. **Bulletin of the World Health Organization**.v.41, p.21-43, 1969.

CORBETT E. L., *et al.* The Growing Burden of Tuberculosis – Global Trends and Interactions with the HIV Epidemic. **Archives of Internal Medicine**. v.163, Maio, 2003.

FONSECA L de S *et al.* Comparative evaluation under routine conditions of the nitrate reduction assay, the proportion assay and the MGIT 960 assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 107(1): 142-144, February 2012.

GRIESS J. P., Z.A.H.H. Bemerkungen. Übere inige Azoverbindungen. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**. v.12, p.426-428, 1879.

GUPTA A *et al.* - Evaluation of the Performance of Nitrate Reductase Assay for Rapid Drug-susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in North India. **Journal of Health Population and Nutrition**. v. 29 (1); 2011 Feb. PMC3075052.

KRITSKI, A. L., *et al.* Tuberculose do ambulatório e enfermaria. Segunda Edição, Editora Atheneu – São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte. p.303, 2000.

LIMA FILHO, M. T. Patogenia da tuberculose. **Jornal de Pneumologia**. v.19, p.11-18, 1993.

MARTIN A., *et al.* Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**. Epub ahead of print. Maio, 2005.

MARTIN A., *et al.* The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 2008; 62:56–65.

MONTORO E., *et al.* Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.55, n.4, p.500-505, Abril, 2005.

PABLOZ-MENDEZ A., *et al.* Global Surveillance for antituberculosis – drug resistance, 1994-1997. **New England Journal of Medicine**. v.338, p.1641-1649, 1998.

PESSOA, Fernando. **Livro do desassossego**. Editora brasiliense. 2ª. Edição. pg. 279, 1984.

PINHEIRO R. S. Determinantes sociais e autorrelato de tuberculose nas regiões metropolitanas conforme a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v.34, n.6, p.446–451, 2013.

RILEY L. W. Isoniazid chemistry, metabolism and mechanism of action in tuberculosis, Rom W. N. & Garay, S. (Eds), **Little, Brown and Company**. New York (USA), p.763-772.

ROSALES S. *et al.* - Field assessment of the direct nitrate reductase assay for rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Honduras. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. 15(9):1206–1210. 2011. The Union.

SAN PEDRO A., OLIVEIRA RM. Tuberculose e indicadores socioeconômicos: revisão sistemática da literatura. **Revista Panamericana de Salud Publica**. 2013;33(4):294–301.

SHIKAMA *et al.* - Rapid detection of resistant tuberculosis by nitrate reductase assay performed in three settings in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2009

THRUSFIELD M *et al.* WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **Veterinary Record**. 2001; 148(18):567-72.

URBANIAK, G. C., & PLOUS, S. (2013). Research Randomizer (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved on June 22, 2013, from <http://www.randomizer.org/>

UFG – Avaliação de testes diagnósticos -
<https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/Modulo2Avaliacaodetestesdiagnosticos.pdf>

WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing, Report. 2008.

WHO. World Health Organization. The Global Plan to Stop TB. 2006-2015.

WHO. World Health Organization. The Stop TB Strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. 2006.

WHO. World Health Organization. World Health Report. 1997.

WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2015.

WHO. World Health Organization. Tuberculosis vaccine development. Immunization, Vaccines and Biologicals. 2015.

WHO - World Health Organization. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug resistant tuberculosis. WHO 2011.

WHO - World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis Fourth Edition. 2009.

WHO - World Health Organization. Implementing tuberculosis diagnostics. Policy framework. WHO 2015.

WHO - World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. 2011.

WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2016.

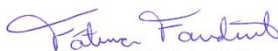
ANEXO A – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA**

Eu, Fatima Cristina Onofre Fandinho Montes, matrícula 0663643, Doutora em Microbiologia, Chefe do Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose e outras Micobacterioses Angela Werneck Barreto do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ESNP/FIOCRUZ, AUTORIZO a servidora Reginalda Ferreira de Melo Medeiros, Tecnologista, matrícula 0759424, estudante de Mestrado em Saúde Pública/CRPHF/ESNP/FIOCRUZ, a realizar os testes de diagnósticos utilizando as cepas estocadas que pertencem ao acervo do Laboratório desse Centro de Referência para a realização do Projeto de Pesquisa DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* ÀS DROGAS RIFAMPICINA E ISONIAZIDA PELO MÉTODO DE NITRATO REDUTASE que tem por objetivo primário avaliar o desempenho do ensaio de nitrato redutase a partir de isolados de *M. tuberculosis*, com o propósito de determinar a susceptibilidade da micobactéria à rifampicina e isoniazida em pacientes com tuberculose pulmonar.

O pesquisador acima qualificado se compromete a:

- 1- Iniciar a coleta de dados somente após o Projeto ser avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Saúde Pública Sergio Arouca – ENSP, da Fundação Osvaldo Cruz, conforme Carta-Circular nº 004/2016 – CEP/ENSP, em anexo.
- 2- Obedecer às disposições do armazenamento das cepas do laboratório, garantindo-lhes a permanência em sua posição na mesma caixa de estoque.
- 3- Assegurar e garantir que não utilizará as informações coletadas em prejuízo da instituição, respeitando deste modo as Diretrizes Éticas da Pesquisa e da Norma de Qualidade NBR ISO/IEC 17025.

Rio de Janeiro, 20 de abril de 2016.


Fátima C. O. Fandinho Montes
Coordenadora Substituta
CRPHF/ENSP/FIOCRUZ
Mat. SIAPE 6 663 643

ANEXO B – CARTA-CIRCULAR Nº 004/2016 – CEP/ENSP



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 18 de abril de 2016.

Carta-Circular nº 004/2016 - CEP/ENSP

Assunto: Esclarecimentos sobre pesquisas que não necessitam análise do Sistema CEP-CONEP

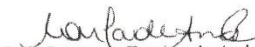
Considerando a Resolução 466/12, que aprova as "diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos";

Considerando o disposto no item VII.1, da mesma resolução: "Pesquisas envolvendo seres humanos devem ser submetidas à apreciação do Sistema CEP/CONEP";

E ainda a definição de pesquisa envolvendo seres humanos, no item II.14, como "pesquisa que, individual ou coletivamente, tenha como participante o ser humano, em sua totalidade ou partes dele, e o envolva de forma direta ou indireta, incluindo o manejo de seus dados, informações ou materiais biológicos";

O CEP/ENSP vem esclarecer aos pesquisadores e alunos da Escola que **não aprecia pesquisas** que não se enquadrem nas definições expostas acima, tais quais:

- Pesquisas que não envolvam seres humanos;
- Pesquisas de meta-análises ou pesquisas bibliográficas;
- Pesquisas que venham a utilizar apenas dados disponíveis a acesso público e irrestrito;
- Pesquisas que tenham como objetivo apenas o monitoramento de um serviço, para fins de sua melhoria ou implementação, que não visam obter um conhecimento generalizável, mas apenas um conhecimento que poderá ser utilizado por aquele serviço ao qual se destina.


Carla Lourenço Tavares de Andrade

Coordenadora do CEP/ENSP

Carla Lourenço Tavares de Andrade
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/ENSP