



PROGRAMA DE
APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS



JAQUELINE SANTARELLI DA SILVA
MIRELLA CAROLINE MARCOLINO DA SILVA

**Nitrato Redutase para detecção fenotípica de sensibilidade às drogas
tuberculostáticas em isolados de Mycobacterium tuberculosis do Hospital das
Clínicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

RIBEIRÃO PRETO

2019



PROGRAMA DE
APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS



JAQUELINE SANTARELLI DA SILVA
MIRELLA CAROLINE MARCOLINO DA SILVA

**Nitrato Redutase para detecção fenotípica de sensibilidade às drogas
tuberculostáticas em isolados de Mycobacterium tuberculosis do Hospital das
Clínicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP, elaborada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP/ Departamento de Microbiologia.

Área: Microbiologia Controle de Infecção Hospitalar

Orientador (a): Dr. Valdes Roberto Bollela

Supervisor (a) titular: Renata Helena C. Poente

RIBEIRÃO PRETO

2019

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, por nos conceder saúde, determinação, perseverança, força para superar as dificuldades.

Agradecemos também, aos nossos pais e familiares, por estarem ao nosso lado durante essa etapa valiosa, sem medir esforços, motivando-nos e servindo de respaldo para que pudéssemos ir além da nossa capacidade de alcançar os nossos maiores objetivos.

Agradecemos a toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por todo ensinamento transmitido, que será fundamental para nossa bagagem de conhecimentos que levaremos conosco por toda a vida.

Agradecemos a nossa Responsável Renata Helena Candido Pocente por estar sempre solícita, que nos conduziu sem medir esforços até a conclusão do aprimoramento, e ao nosso orientador Dr. Valdes Roberto Bollela pela orientação à elaboração deste trabalho.

Agradecemos também, as nossas colegas de aprimoramento que tornaram essa jornada menos árdua, Brenda, Luana, Verônica, e Jênifer, onde cada uma contribuiu de uma forma diferente tornando essa etapa ainda mais valiosa.

RESUMO

A tuberculose (TB), atualmente continua sendo um importante problema de saúde pública, pois se encontra entre as principais doenças infecciosas mundiais. Portanto, a detecção precoce de resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da TB, representa um desafio aos Programas de Controle de Tuberculose (PCT), pois, a maioria dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos necessita do isolamento do bacilo em meio de cultivo, e os métodos convencionais demandam tempo, portanto atualmente algumas pesquisas propõem como alternativa o método de redução de nitrato a nitrito, pois a importância científica do método de redução de nitrato (MRN) está em sua rapidez, e na comprovada capacidade na detecção de cepas resistentes em várias regiões do mundo, então, além de rápido é de fácil execução, e não necessita de equipamentos específicos. O presente estudo, tem como objetivo comparar a eficácia dos testes frente aos métodos convencionais disponíveis hoje no mercado. Foram utilizadas 35 amostras de escarro e escarro induzido dos pacientes com culturas positivas para *Mycobacterium tuberculosis* do laboratório de micobactérias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no ano de 2018. Baseado nos resultados obtidos, o kit sire nitratase representa uma excelente alternativa de diagnóstico precoce frente às drogas tuberculostáticas para laboratórios de recursos limitados, pois libera os resultados de mais rapidamente, e a leitura é de fácil realização e compreensão.

Palavra Chave: Tuberculose. Teste de sensibilidade. Redução de nitrato.

Lista de Figuras

Figura 1: Espécies de micobactérias classificadas conforme patogenicidade para seres humanos	17
Figura 2: Desenho esquemático da estrutura da parede celular das micobactérias, mostrando a organização dos seus componentes	18
Figura 3: Procedimento de realização do teste	20
Figura 4: Leitura do teste	21
Figura 5: Leitura do teste	21

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultados obtidos através do teste kit SIRE	23
Tabela 2: Comparação dos Resultados obtidos entre GENE XPERT e KIT SIRE	25
Tabela 3: Comparação dos Resultados obtidos entre MTBDRplus e KIT SIRE	26
Tabela 4: Comparação dos resultados obtidos com a Técnica MGIT-SIRE (LUTZ) e Kit Sire Nitratase	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Tipo de estudo	13
3.2 Processamento das amostras	13
3.2.1. Baciloscopia direta	13
3.2.2. Cultura	14
3.2.3 Teste Rápido Molecular (TRM) Genexpert	15
3.2.4 Diferenciação entre <i>M. tuberculosis</i> e Micobactérias não causadoras de Tuberculose	16
3.3 GENOTYPE MTBDR PLUS VER 2.0 – HAIN LIFESCIENCE: DNA strip	17
3.4 Realização do teste Kit SIRE Nitratase	18
4 RESULTADOS	22
5 DISCUSSÃO	28
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIA	30

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), é uma doença infecciosa que há muito tempo acomete humanos. Existem relatos históricos que mostram TB em ossos humanos encontrados na Alemanha, datados de 8.000 anos antes de Cristo (ac), e relatos de TB encontrados na coluna vertebral e ossos de esqueletos egípcios, datados de 2.500 ac. É causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, ou bacilo de Koch (BK) identificado em 1882, por Robert Koch. Ele afeta tipicamente pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros locais (TB extrapulmonar).

A doença pode ser transmitida quando as pessoas com a doença pulmonar ao tossir, expõem as bactérias através de aerossóis. Estima-se que uma proporção relativamente pequena (5-10%) das pessoas infectadas (1,7 bilhão) pelo *M. tuberculosis* desenvolverá a doença da TB durante seu tempo de vida. No entanto, a probabilidade de desenvolver a tuberculose é muito maior entre as pessoas infectadas com o HIV; também é maior entre as pessoas afetadas por fatores de risco como desnutrição, diabetes, tabagismo e consumo de álcool.

A tuberculose continua sendo um importante problema de saúde pública no mundo, então, para viabilizar essa resposta global, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aprovou, na Assembleia Mundial da Saúde de 2014, a Estratégia End TB (pelo Fim da Tuberculose), que propõe uma mudança radical de paradigma na luta contra a TB, com o objetivo de eliminar a doença como problema de saúde pública: reduzir em 90% os casos de TB, e reduzir em 95% as mortes por TB até 2035, em comparação a 2015, eliminando também o impacto econômico para as famílias afetadas pela doença estratégica. (BARREIRA, 2018).

Centenas de milhares de casos de tuberculose Multidroga resistente (MDR/TB) foram detectados e notificados em 2017. A resistência antimicrobiana representa agora uma séria ameaça à saúde pública e à estabilidade econômica mundial. Estima-se, que um terço de todas as mortes associadas resistência antimicrobiana é agora causada por tuberculose multirresistente (MDR) O sucesso do tratamento continua baixo, com 55% mundialmente. Exemplos de países de alta carga da doença em que melhores taxas de sucesso do tratamento estão sendo

alcançadas incluem Bangladesh, Etiópia, Cazaquistão, Mianmar e Vietnã (todos com taxas superiores a 70%). Fechar as lacunas na detecção e tratamento requer muito maior cobertura aos testes de sensibilidade a medicamentos entre pessoas diagnosticadas com TB, reduzindo o subdiagnóstico da TB. Isolados de *M. tuberculosis* resistentes a drogas continuam a emergir e se espalhar devido às inadequações nos programas nacionais de tuberculose. Em 2016, estima-se que 490.000 pessoas desenvolveram Tuberculose MDR, e um adicional de 110.000 pessoas desenvolveram tuberculose resistente a rifampicina. Estima-se que apenas até 50% dos pacientes com MDR as tuberculoses são curadas.

Além do efeito econômico sobre os sistemas de saúde, a tuberculose afeta predominantemente as pessoas de idade ativa e, por conseguinte, tem um impacto considerável a economia mundial. Nas taxas atuais de progresso, estima-se que 161 milhões de casos de tuberculose diagnosticada e 28 milhões de mortes ocorrerão antes 2030. (HERBERT et al., 2018).

A detecção precisa da tuberculose é essencial para orientar o tratamento, ainda que as taxas de detecção e notificação de casos sejam baixas, com 40% dos casos incidentes estimados não sendo identificados e relatados. O subdiagnóstico permanece um problema, particularmente em países onde os pacientes com barreiras geográficas e socioeconômicas substanciais tenham dificuldades para acessar os cuidados de saúde. Na maioria dos países com alta incidência de tuberculose a detecção de casos depende de os pacientes relatarem sintomas a uma unidade de saúde. Atrasos no acesso a tratamento efetivo proporciona maior oportunidade de transmissão e continuação da epidemia. Acesso a testes para resistência a medicamento medicamentos continua inadequada. Em 2016, apenas 33% dos pacientes com tuberculose bacteriologicamente confirmada que não foi previamente tratados foram testados quanto à resistência à rifampicina, enquanto 60% dos pacientes que receberam previamente tratamento antituberculose por pelo menos 1 mês, e que foram considerados em maior risco de resistência, foram testados.

É necessária uma ação urgente para melhorar a cobertura e qualidade do diagnóstico, tratamento e cuidados para pessoas com TB resistente aos

medicamentos. Existem diferentes procedimentos laboratoriais que possibilitam o diagnóstico da tuberculose. Os testes diagnósticos incluem:

Testes moleculares rápidos - O único teste rápido para diagnóstico de TB atualmente recomendado pela OMS é o teste Xpert® MTB / RIF (Cepheid, EUA). Pode fornecer resultados dentro de 2 horas, e foi inicialmente recomendado (em 2010) para diagnóstico de TB pulmonar em adultos, também foi recomendado para diagnosticar formas específicas de TB extrapulmonar. O teste tem muito melhor precisão do que a microscopia de baciloscopia de escarro.

Microscopia de baciloscopia de escarro - Desenvolvido há mais de 100 anos, essa técnica exige o exame de amostras de expectoração usando um microscópio para determinar a presença de Bacilos Álcool - Ácido resistentes, através de coloração de Ziehl-Neelsen, Kinyon ou fluorescente. Também usados para outras amostras biológicas.

Métodos baseados na cultura - Estes formam o padrão de referência atual; eles exigem mais capacidade laboratorial desenvolvida e pode demorar até 12 semanas para fornecer resultados. Eles podem ser sólidos, líquidos, bifásicos e automatizados. Os meios sólidos mais utilizados são Lowenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh. Já entre os líquidos se encontram Middlebrook 7H9 e Middlebrook 7H9 modificado, e os bifásicos está o sistema Septi-Check. (MURRAY; ROSENTHAL; A PFALLER, 2017).

Mundialmente, o uso de testes moleculares rápidos está aumentando, e muitos países estão eliminando o uso de baciloscopia para fins de diagnóstico (embora a microscopia e a cultura permaneçam necessário para o monitoramento do tratamento).

A sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas pode ser avaliada pelo método das concentrações absolutas, método da razão de resistência e o método das proporções. Esses são considerados os métodos clássicos ou convencionais para Teste de Sensibilidade de *M. tuberculosis*. Atualmente, para algumas espécies de micobactérias, a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da droga é o método recomendado. Assim como para a cultura, existem os sistemas comerciais

automatizados para realizar o Teste de Sensibilidade utilizando meios de cultura líquidos.

Também existem testes moleculares para TB que são resistentes aos medicamentos anti-TB de primeira e segunda linha.

Dentre os métodos moleculares, podemos citar: Xpert MTB / RIF, que simultaneamente testa para TB e resistência à rifampicina (o mais efetivo medicamento anti-TB de primeira linha); ensaios de sonda de linha rápida (LIPAs) que testam a resistência à rifampicina e isoniazida (ex: GENOTYPE MTBDR PLUS) e também que testa a resistência às fluoroquinolonas e medicamentos anti-TB injetáveis (GENOTYPE MTBDR SL), e também tecnologias de sequenciamento DNA.

Para métodos fenotípicos, podemos citar BD BACTEC MGIT 960-SIRE-Kit, método não radioativo e qualitativo rápido. O teste baseia-se no crescimento de isolados de micobactérias, previamente identificadas, num tubo contendo fármaco numa concentração pré-definida com a estabelecida para a terapêutica, que é comparado com um tubo isento de fármaco. A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo controle de crescimento, é usada pelo instrumento para determinar os resultados da sensibilidade. (NUNES, 2016).

Método das proporções, descrito por Canetti, Rist e Grosset em 1963 (teste padrão) e em 1969 (teste simplificado). A versão simplificada do teste, com apenas uma concentração da droga, é a mais utilizada. Consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes – “concentração crítica”. Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente – “proporção crítica”.

Algumas pesquisas atualmente propõem como alternativa o método de redução de nitrato a nitrito, que tem como base, o fato que durante o crescimento o *M. tuberculosis* utiliza o nitrato transformando em nitrito, isso é revelado no meio com a mudança de cor. Esse método consegue liberar resultados mais rápidos

quando comparado com o método das proporções, disponibilizando os resultados entre 7 a 14 dias. A importância científica do teste está em sua rapidez e na comprovada acuidade na detecção de cepas resistentes. (SHIKAMA et al., 2009).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar o desempenho do teste Nitrato Redutase para o diagnóstico precoce de resistência às drogas tuberculostáticas, através da comparação de resultados de diferentes técnicas genotípicas e fenotípicas obtidos do sistema interno do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

2.2 Objetivos específicos

Analisar os isolados de MTB sensíveis, resistentes e multirresistente dos pacientes atendidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

Analisar o desempenho das técnicas fenotípicas e genotípicas para o diagnóstico quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Comparar o desempenho do teste fenotípico Nitrato Redutase frente aos outros métodos de detecção de sensibilidade às drogas tuberculostáticas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Refere-se a um estudo do tipo experimental, onde inicialmente foram separadas 35 cepas de MTB isolados de amostras de escarro de pacientes atendidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto período de 2018. Em seguida, essas cepas foram para ressemeadas em meio de cultura Lowenstein Jensen para obtenção de colônias em fase log de crescimento (média 21 dias) para realização da técnica, na qual propõe se comparar a efetividade do método Nitrato Redutase com os resultados obtidos pelos métodos GeneXpert, Genotype MTBDRplus e MGIT SIRE.

3.2 Processamento das amostras

As amostras clínicas estudadas foram originadas da investigação médica de pacientes com provável doença pulmonar e que foram enviadas ao laboratório de micobactérias para pesquisa direta e cultivo de micobactérias. Todos os casos eram oriundos de pacientes atendidos nos ambulatórios e/ou enfermarias do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FMRP – USP).

3.2.1. Baciloscopia direta

Em amostras de escarro e escarro induzido, a baciloscopia é realizada em uma lâmina limpa, seca e sem gordura, onde com o auxílio de um palito de madeira se retira uma partícula mais purulenta de uma amostra e a deposita na lâmina, em seguida, a amostra é distendida até o extremo oposto da lâmina com movimentos de vai e vem em cima da amostra até obter um esfregaço homogêneo que cubra dois terços da lâmina, sem deixar espaços vazios. Por fim, é feita a coloração pelo método de Ziehl Neelsen, no qual as lâminas são colocadas em um suporte, sem encostar umas nas outras e com o esfregaço voltado para cima, e em seguida são

cobertas com fucsina fenicada a 0,3% (previamente filtrada para evitar os cristais formados devido ao repouso do corante), em seguida, na ponta de uma haste de metal com um chumaço de algodão embebido em álcool etílico, colocar fogo no algodão e passar a chama lentamente sob as lâminas até que ocorra a emissão de vapores, a partir daí, contar 5 minutos e passar a chama sob lâminas mais duas vezes durante esse tempo. Abrir devagar a torneira até obter um filete de água corrente para lavar as lâminas, deixar o filete de água cair em cima do número de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço até eliminar todo o corante, em seguida, cobrir completamente cada lâmina com a solução descorante de álcool-ácido a 3%, e esperar 2 minutos, enxaguar em água corrente para eliminar o álcool-ácido, por fim, cobrir o esfregaço de cada uma das lâminas com o azul de metileno a 0,3% (previamente filtrado) e aguardar durante 3 minutos, enxaguar pela última vez o esfregaço até eliminar todo o corante e colocar as lâminas para secar em pé sobre papel absorvente.

3.2.2. Cultura

Após a confecção da lâmina para a baciloscopia, as amostras são transferidas para um tubo de polietileno graduado e estéril e passam por um processo de descontaminação pelo método de Petroff, onde se usa uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% com indicador de vermelho de fenol, como agente de descontaminação e fluidificação, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, dobra-se o volume da amostra, em seguida, a amostra é vortexeada até formar uma mistura homogênea e incubada em estufa a 35°C por 15 minutos, depois é centrifugada por mais 15 minutos a 3000 RPM. Após ser retirada da centrífuga, é desprezado o sobrenadante e o sedimento é ressuspenso, então é gotejada uma solução de ácido clorídrico a 4% até que seja visível a viragem de cor de rosa para amarelo, por último é feita a neutralização com uma solução contendo concentração menor de NaOH, vermelho de fenol e sulfato de alumínio e potássio, até a viragem de cor de amarelo para rosa. Então, é transferido 500µL da amostra, já

descontaminada, para o meio de cultura líquido Middlebrook 7H9, previamente suplementado com MGIT™ PANTA contendo nutrientes para auxiliar o crescimento, e antibióticos para evitar o crescimento de contaminantes, sendo este incubado no sistema BBL™ MGIT™960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton & Dickinson®).

O restante da amostra descontaminada é reservada para o Teste Rápido Molecular - GeneXpert.

3.2.3 Teste Rápido Molecular (TRM) Genexpert

O GeneXpert MTB/RIF, teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) é um teste automatizado, simples, rápido e de fácil execução nos laboratórios. O teste detecta simultaneamente o *Mycobacterium tuberculosis* e a resistência à rifampicina (RIF) em aproximadamente 2 horas. O TRM-TB utiliza a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para extração, amplificação e detecção do DNA do *M. tuberculosis* e triagem de cepas resistentes à rifampicina. O teste é executado com risco mínimo de contaminação, podendo ser realizado em laboratórios com condições básicas de biossegurança. É um equipamento composto por módulos com cartuchos individuais de uso único onde se coloca uma alíquota de amostra para a detecção de moléculas por reação em cadeia da polimerase. O sistema pode fazer diagnóstico rápido de várias doenças infecciosas ou oncológicas, mas no Brasil está sendo usado para a detecção da TB utilizando o cartucho de Xpert MTB/RIF. O equipamento, que conta com computador e software próprios, fornece o resultado em aproximadamente 105 minutos, mas requer rede elétrica estável para o seu funcionamento e acondicionamento dos cartuchos em ambiente refrigerado entre 2° e 28°C. Dados de acurácia do novo teste demonstraram uma sensibilidade de 89% (IC95%: 85%; 92%) e especificidade de 99% (IC95%: 98%; 99%) em substituição à baciloscopia de primeira amostra para a detecção de TB. Material insuficiente (escarro) ou inadequado (presença de saliva) são problemas observados durante a sua realização.

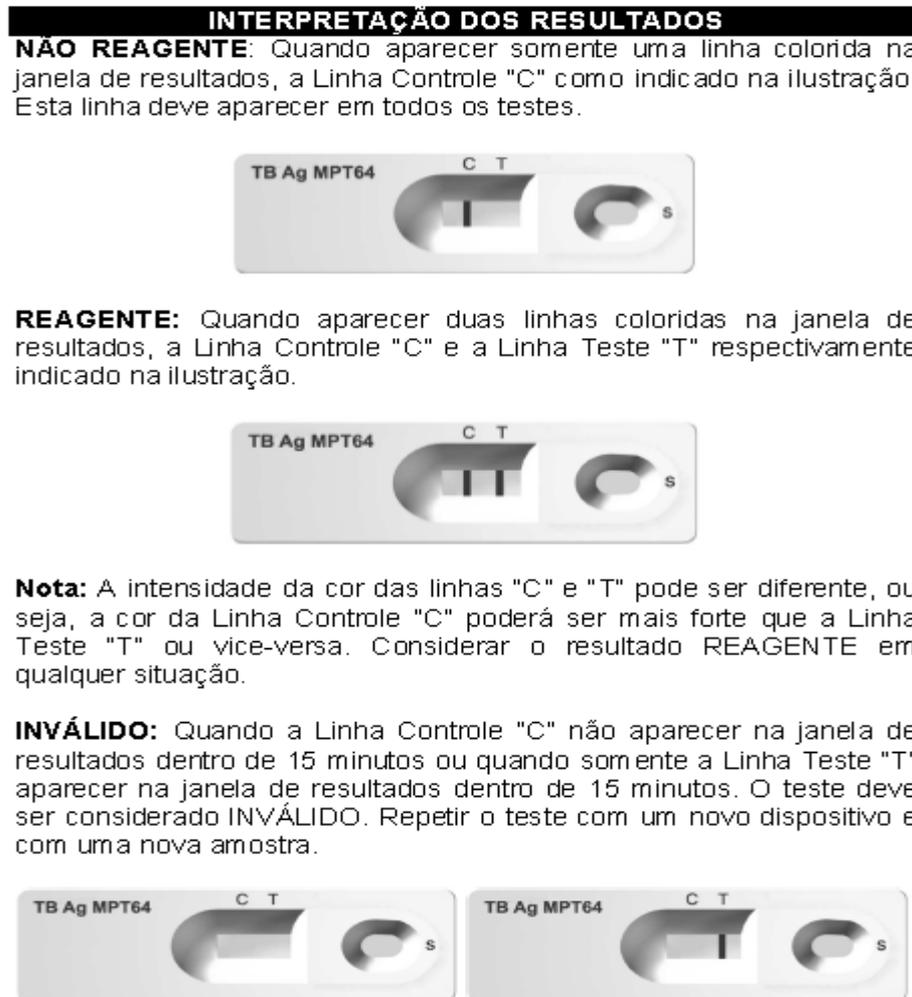
A realização do teste rápido molecular no laboratório de micobactérias do HCFMRP, ocorre em pelo menos uma amostra de escarro por paciente com suspeita de tuberculose.

Após descontaminação da amostra para cultura, é reservada uma alíquota de no mínimo 1,0 ml do sedimento descontaminado e, a partir deste, é adicionado o tampão para fluidificação e adicionado no cartucho para realização do teste.

3.2.4 Diferenciação entre *M. tuberculosis* e Micobactérias não causadoras de Tuberculose

A diferenciação do gênero *Mycobacterium* foi realizada através do teste imunocromatográfico (ALERE® TB Ag MPT64), que se baseia na identificação qualitativa do complexo *M. tuberculosis* através da detecção de anticorpos anti-MPT64, que é uma das proteínas presentes nestas micobactérias, e a presença ou não destes anticorpos é utilizada para diferenciação entre o complexo *M. tuberculosis* e as MNT. Figura 1 - Interpretação dos resultados fornecidos pelo teste imunocromatográfico ALERE® TB Ag MPT64. As amostras com resultado positivo são encaminhadas para o teste de sensibilidade às drogas Genotype MTBDR plus.

Figura 1: Espécies de micobactérias classificadas conforme patogenicidade para seres humanos



Fonte: Bula

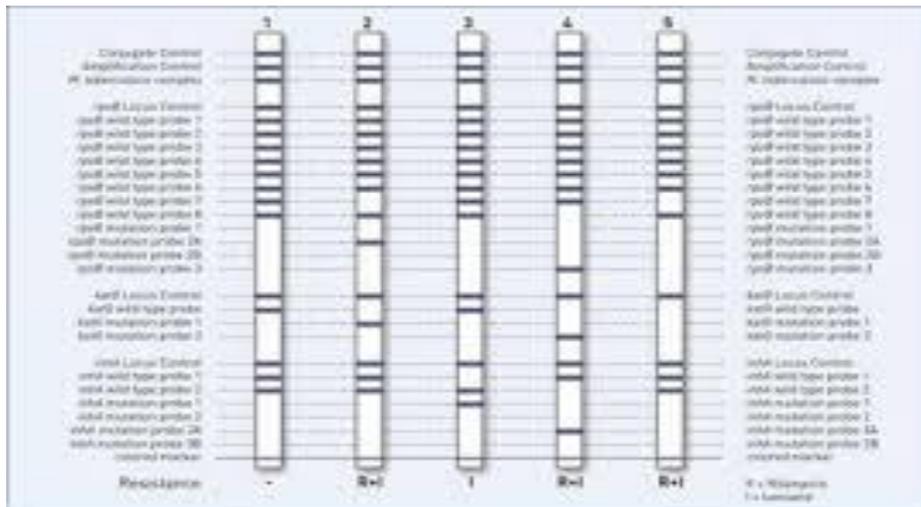
3.3 GENOTYPE MTBDR PLUS VER 2.0 – HAIN LIFESCIENCE: DNA strip

É um teste qualitativo para identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência a rifampicina e/ou Isoniazida. São incluídas espécies do complexo *M. tuberculosis*.

A resistência a Rifampicina - **gene rpoB** (que codifica a subunidade beta da ARN polimerase).

Resistência à isoniazida - **gene katG** que codifica a catalase peroxidase e a região promotora do **gene inhA**, que codifica o NADH-enoil-ACP-redutase.

Figura 2: Desenho esquemático da estrutura da parede celular das micobactérias, mostrando a organização dos seus componentes.



Fonte: Bula

3.4 Realização do teste Kit SIRE Nitratase

O kit é composto por sete tubos de vidro com tampa de rosca, tamanho 16x150mm com meio cultura Lowenstein Jensen (LJ), porém quatro desses tubos contém o KNO₃ (Nitrato de Potássio) com os fármacos SIRE (Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol), e os outros três tubos são para controle, que contém apenas o KNO₃.

Para realização do procedimento, deve-se transferir com alça bacteriológica descartável estéril o maior número de colônias, sendo no mínimo 20 colônias em sua fase de crescimento logarítmica (média de 21 dias culturas primárias) para um tubo contendo entre 5 a 6 pérolas de vidro em 2,0 ml de água destilada, em seguida homogeneizar com agitador mecânico por aproximadamente 10 a 20 segundos e deixar repousar por 10 minutos para sedimentação dos aerossóis. Depois disso, realizar mais duas suspensões bacteriana, que por sua vez a primeira deve-se transferir o sobrenadante para outro tubo para ajustar a escala de McFarland nº1, e

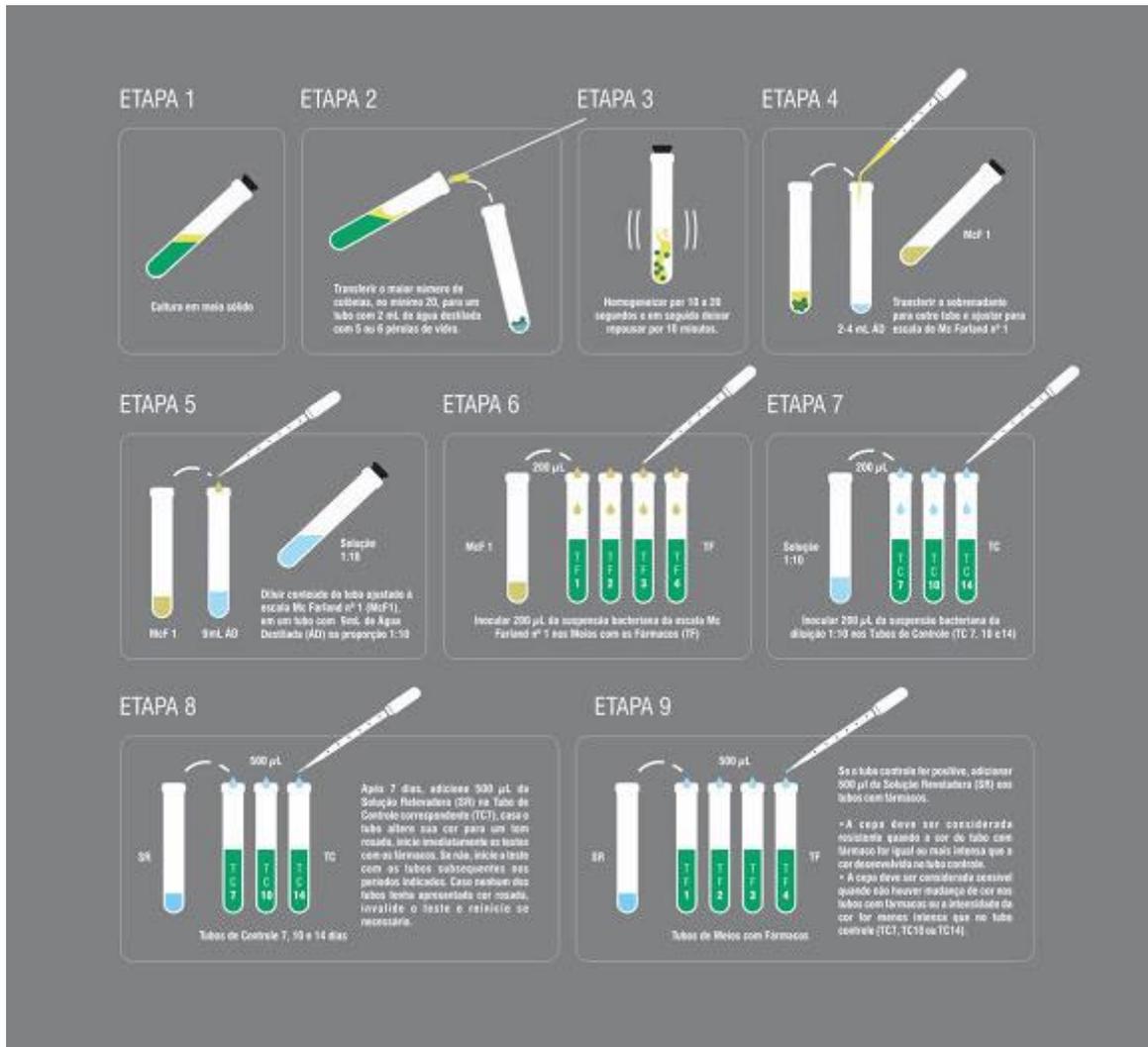
a segunda é a diluição 1:10 em solução tampão fosfato (PBS), ou água destilada estéril, onde 1mL da suspensão da escala McFarland nº1 será diluída em 9 ml de PBS ou água destilada estéril.

Após essa etapa, ocorre à inoculação da suspensão nos meios, então 200uL da suspensão bacteriana da escala de McFarland nº1 vai para os quatros tubos contendo os fármacos, e nos três tubos controles sem os fármacos adicionar 200 uL da suspensão diluída 1:10, rosquear os tubos sem fechar completamente, incubando-os até por vinte e quatro horas, para depois desse período fechar por completo a fim de evitar a evaporação do líquido. Tal processo foi exemplificado na figura 3.

As incubações de todos os tubos devem ser na posição vertical a 37°C por sete, dez ou catorze dias respectivamente, dependendo do resultado da revelação do tubo controle. Então, para a realização da leitura do teste é preparado às soluções reveladoras (A, B, C), que serão adicionadas com uma pipeta de 500uL no tubo controle de sete dias. Se ocorrer a mudança de cor, isto é, de incolor para rosa, adicionar a solução reveladora também nos tubos com fármacos. Se não houver a mudança de cor no sétimo dia, a leitura deve ser refeita no décimo, e ou no décimo quarto dia

A interpretação dos resultados é feita através da alteração na coloração, pois quando a cor do tubo com fármaco for igual ou mais intensa que a cor rosa desenvolvida no tubo controle, indica crescimento bacteriano frente às drogas, ou seja, resistência. E quando não houver alteração na coloração a cepa deve ser considerada sensível. Pode se observar como fica a leitura do teste na figura 4 e 5, onde se tem 2 exemplos de possível leitura do teste.

Figura 3: Procedimento de realização do teste



Fonte: <http://blog.plastlabor.com.br/post/145204022602/kit-sire-nitratase-deteccao-tuberculose>

Figura 4: Leitura do teste



Fonte: Autoria própria

Figura 5: Leitura do teste



Fonte: Autoria própria

4 RESULTADOS

Foram selecionados a partir do período de janeiro a novembro de 2018, 34 isolados de amostras de escarro, e escarro induzido, em culturas positivas dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Desses isolados foram realizados o teste fenotípico de sensibilidade pelo Método Nitrato Redutase, onde 8,8% (3/34) apresentaram resistência a todas as drogas do arsenal terapêutico, e 50% sensibilidade a todas as drogas (17/34). Do total dos isolados, 41,1% (14/34) apresentaram perfil de resistência à Estreptomicina (STR). Já a isoniazida (INH) mostrou resistência à 29,4% (10/34), e 2,9% (1/34) apresentou resultado indeterminado (N° 17). Já, à rifampicina, mostrou resistência à 26,4% (9/34), dos isolados e o Etambutol resistência a 20% (7/34).

A leitura do teste ocorreu a partir do 7° dia, onde 88,2% (30/34) dos testes a leitura aconteceu dentro desse limiar de tempo, utilizando então o 1° controle, e 5,8% (2/34) a leitura ocorreu no 10° dia (N°3, 17) com o 2° controle, e apenas 2,9% (1/34) a leitura sucedeu no 14° dia. (N° 5). Esses estão representados na tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos através do teste kit SIRE

Nº	STR	INH	RIF	EMB
1	R	R	R	R
2	S	S	S	S
3	R	R	R	S
4	S	S	S	S
5	S	R	R	R
6	R	S	S	S
7	S	S	S	S
8	R	S	S	S
9	R	R	R	R
10	S	R	S	S
11	S	S	S	S
12	R	S	S	S
13	R	S	R	S
14	S	S	S	S
15	R	R	R	R
16	R	R	S	R
17	R	I	S	S
18	R	R	R	R
19	S	S	S	S
20	S	S	S	S
21	S	S	S	S
22	S	S	S	S
23	S	S	S	S
24	S	S	S	S
25	S	S	S	S
26	S	S	S	S
27	S	S	S	S
28	R	S	S	S
29	S	R	R	S
30	R	S	S	S
31	S	S	S	S

32	S	S	S	S
33	R	R	R	R
34	S	S	S	S

Fonte: Autoria própria

A tabela 2 demonstra que, dos 34 isolados que tiveram resultados através do GeneXpert, 5,8%(2/34) deu inconformidade entre os resultados, onde no teste genotípico GeneXpert apresentou sensibilidade à rifampicina, enquanto no teste fenotípico Nitrato Redutase apresentou resistência (N°29, 33).

Das amostras, 14,5% (5/34) não foi realizado o teste genotípico (N° 2,7,11,15,20) e 5,8% (2/34) apresentou resultado negativo, ou seja, falso negativo (N°3 e 28). E 8,8% (3/34) das amostras não obtiveram resultado (N°8, 10,18,) devido ao erro 5007.

Tabela 2: Comparação dos Resultados obtidos entre GENE XPERT e KIT SIRE

GENEXPERT		KIT SIRE NITRATASE
Nº	RIF	RIF
1	R	R
2	Não realizado	S
3	Neg.	R
4	S	S
5	R	R
6	S	S
7	Não realizado	S
8	ERRO	S
9	R	R
10	ERRO	S
11	Não realizado	S
12	S	S
13	R	R
14	R	S
15	Não realizado	R
16	S	S
17	S	S
18	ERRO	R
19	S	S
20	Não realizado	S
21	S	S
22	S	S
23	S	S
24	S	S
25	S	S
26	S	S
27	S	S
28	Neg.	S
29	S	R

30	S	S
31	S	S
32	S	S
33	S	R
34	S	S

Fonte: Autoria própria

Entre os resultados obtidos a partir do MTBDRplus 20,5% (7/34) foram incompatíveis com teste da nitratase, que por sua vez 8,8% (3/34) apresentou diferença entre as 2 drogas (rifampicina e isoniazida) de cada teste (N° 2, 29, 33). E 11,7% (4/34) apresentou diferença parcial entre às drogas de cada teste (N° 3, 8, 14, 18). E 2,9% (1/34) apresentou resultado indeterminado a RIF e INH no teste MTBDRplus e indeterminado também à INH, do teste Nitratase (N° 17).

Entre os 7 isolados que apresentaram incompatibilidade, 57,1% (7/4), apresentaram perfil de sensibilidade no teste genotípico, e resistência no teste fenotípico (N°3, 8, 14, 33). Sendo que a amostra N°33 contaminou, verifica-se tais resultados na tabela 3.

Tabela 3: Comparação dos Resultados obtidos entre MTBDRplus e KIT SIRE

N°	MTBDRplus		KIT SIRE NITRATASE	
	RIF	INH	RIF	INH
1	R	R	R	R
2	R	R	S	S
3	R	S	R	R

4	S	S	S	S
5	R	R	R	R
6	S	S	S	S
7	S	S	S	S
8	R	S	S	S
9	R	R	R	R
10	S	R	S	R
11	S	S	S	S
12	S	S	S	S
13	R	S	R	S
14	R	S	S	S
15	R	R	R	R
16	S	S	S	R
17	I	I	S	I
18	R	S	R	R
19	S	S	S	S
20	S	S	S	S
21	S	S	S	S
22	S	S	S	S
23	S	S	S	S
24	S	S	S	S
25	S	S	S	S
26	S	S	S	S
27	S	S	S	S
28	S	S	S	S
29	S	S	R	R
30	S	S	S	S
31	S	S	S	S
32	S	S	S	S
33	S	S	R	R
34	S	S	S	S

Fonte: Autoria própria

E por fim, na tabela 4 encontram-se 34 amostras, das quais 14,7% (5/34) foram realizados o teste de sensibilidade no MGIT SIRE do Instituto Adolfo Lutz, e 80% (5/4) dos resultados obtidos foram compatíveis entre ambas as técnicas. (Tabela 4). Então, 20% (1/5) apresentou resistência (INH, RIF) no teste MGIT-SIRE, enquanto no teste da nitratase expressou sensibilidade. (Nº 2).

Tabela 4: Comparação dos resultados obtidos com a Técnica MGIT-SIRE (LUTZ) e Kit Sire Nitratase

Nº	MGIT-SIRE			KIT SIRE NITRATASE		
	INH	RIF	EMB	INH	RIF	EMB
2	R	R	-	S	S	S
3	-	-	S	R	R	S
4	S	S	-	S	S	S
5	R	R	-	R	R	R
31	S	S	-	S	S	S
32	-	-	-	S	S	S
33	-	-	-	R	R	R
34	-	-	-	S	S	S

Fonte: Autoria própria

5 DISCUSSÃO

O método de redução de nitrato atualmente é uma alternativa de detecção do *Mycobacterium tuberculosis* e também na detecção de cepas resistentes. E a importância científica do teste está em sua rapidez (SHIKAMA et al., 2009)

O presente estudo mostrou que foi possível realizar a leitura de todos isolados, com poucas intercorrências, em um curto período de tempo, onde apenas

2,9% dos testes que à leitura ocorreu no 14º dia com o último controle. E dessas amostras, 5,8% obtiveram crescimento oriundo de uma possível contaminação, mas obteve-se a revelação do teste, porém impossibilitou a leitura correta (Nº 23, 34).

Os métodos mais comuns para o diagnóstico da TB em todo o mundo são: o exame direto (baciloscopia) e a cultura (considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico). Porém, a baciloscopia de escarro tem sensibilidade média em 40-60% e a cultura pode levar de 3 a 6 semanas para se obter um resultado. Nesse contexto, a utilização dos métodos moleculares, é importante porque apresenta possibilidades de determinação rápida da resistência (NEVES, 2016)

O método GeneXpert MTB/RIF é uma técnica simples, e o que diferencia dos outros métodos é o resultado rápido, porém, se for detectado a resistência a Rifampicina a OMS recomenda repetir o teste em outra amostra do paciente, então dessa forma o tratamento deve ser iniciado após o teste molecular detectar repetidamente a resistência. (LIMA ET AL., 2017).

Ao avaliar os testes realizado pelo GeneXpert, pode-se observar que do total das amostras, 14,7% não foram realizadas, pois todas as amostras passam por um critério de avaliação, sendo necessário analisar a quantidade e a qualidade do material, para evitar intercorrências, como de exemplo o erro 5007. No entanto, 8,8% das amostras não se obteve resultados, devido esse erro, e ele é identificado por uma série de fatores, tais como: reagente em más condições, amostra incorretamente processada no cartucho, quantidade incorreta de reagente no cartucho e falha na transferência de líquido, em razão disso, deve-se executar novamente o teste com cartuchos novos (BRASIL, 2015).

O método MGIT SIRE é padrão ouro, pois o menor tempo de incubação, entre 5 a 12 dias é deste método, e a leitura é automatizada, e, o inóculo é padronizado. Embora, seja a opção mais utilizada atualmente no mercado devido ser de fácil e confiável realização, este método necessita de infra-estrutura em biossegurança que não pode ser implementada facilmente em locais com poucos recursos, portanto contrapondo os métodos automatizados, o kit Sire Nitratase, não necessita de recursos sofisticados para sua realização. (KONEMAM et al., 2010).

Os resultados demonstram, que 14,7% fizeram o teste MGIT-SIRE no Instituto Adolfo Lutz, e que desses isolados, 80% dos resultados foram compatíveis, entre as

técnicas, exceto 1 amostra que apresentou resistência no MGIT-SIRE e sensibilidade no teste da Nitratase.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos das técnicas presentes, o kit sire nitratase representa uma notável alternativa de diagnóstico precoce frente às drogas tuberculostáticas para laboratórios de recursos limitados, pois libera os resultados de 14 a 7 dias, e a leitura é de fácil realização.

REFERÊNCIA

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

ARBEX, Marcos Abdo et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.626-640, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

BARREIRA, Draurio. Os desafios para a eliminação da tuberculose no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 27, n. 1, mar. 2018. Instituto Evandro Chagas.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Rede de Teste Rápido para Tuberculose no Brasil: Primeiro ano da implantação**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 63 p. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 03 nov. 2018

HERBERT, Nick et al. Concrete action now: UN High-Level Meeting on Tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.709-710, jul. 2018. Elsevier BV.

KONEMAM, Elmer W. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010
LIMA, Taiza Maschio de et al. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.65-76, jun. 2017. Instituto Evandro Chagas.

MANSUR, Maria de Fátima Filardi Oliveira et al. Avaliação do teste de nitrato redutase para a detecção rápida de resistência aos medicamentos de primeira linha em cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas de pacientes em um hospital geral. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.210-213, abr. 2012. FapUNIFESP (SciELO).

MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL. Brasília, Df: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf>. Acesso em: 08 out. 2018

MELLO, Fernanda Carvalho de Queiroz; SILVA, Denise Rossato; DALCOLMO, Margareth Pretti. Tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.82-82, abr. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Org.). Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, [s. L.], v. 48, n. 8, p.1-11, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Org.). Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, [s. L.], v. 48, n. 8, p.1-11, 2017

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; A PFALLER, Michael. **Microbiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

NUNES, Ana Rute Serrano. **Relatório de Estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar S. João, Porto**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2016.

ROGERIO, Wesley Pereira et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* entre agentes comunitários de saúde no Brasil, usando-se a prova tuberculínica. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 31, n. 10, p.2199-2210, out. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.525-532, ago. 2002. FapUNIFESP (SciELO)

RUEDA, Johana et al. GenoType® MTBDRplus 1.0 para detección de resistencia cruzada entre isoniazida y etionamida en aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* multifármaco-resistente. *Biomédica*, [s.l.], v. 35, 6 jul. 2015. Instituto Nacional de Salud (Colombia).

SILVA, Denise Rossato et al. Tuberculosis series. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.71-72, abr. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

World Health Organization. **Global tuberculosis report 2018**. Genebra, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/274453>>. Acesso em: 5 nov. 2018

XPert MTB/RIF NO Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, [S.l.], v. 5, n. 16, p.1-14, set. 2011.