

Comportamento fenotípico de redução do nitrato em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*

Waldery Joffely de MENEZES¹, Júlia Ignez SALEM²; Luciana Botinelly Mendonça FUJIMOTO³.

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA/ ²Orientadora CPCS/INPA/³Co-orientadora DPML/UFAM.

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa crônica, causada pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis* (principal agente), *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*, todos pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (CMTB), do qual também fazem parte os *M.bovis*-BCG, *M. caprae*, e *M. pinnipedii* (Brasil 2008).

O teste de redução do nitrato detecta a capacidade das micobactérias de reduzirem o nitrato (NO₃⁻) a nitrito (NO₂⁻) pela ação da enzima nitrato-redutase, em condições anaeróbicas com objetivo de obter o oxigênio do nitrato para seu metabolismo. Os nitritos formados na reação, em contato com ácido acético ou clorídrico, quando adicionado de sulfanilamida e naftiletilenodiamina, apresentam coloração rosa, devido à produção do azo-corante parasulfobenzenoato-alfa-naftilamina (Brasil 2008).

Mundialmente, o teste de redução do nitrato é utilizado, entre outros, para: a) a diferenciação de *M. tuberculosis* (nitrato-redutase positivo) de *M. bovis* (nitrato-redutase negativo), b) para classificação de isolados de *M. africanum*, na diferenciação das variantes I (nitrato-redutase negativo) e II (nitrato-redutase positivo), e c) para classificar algumas micobactérias não tuberculosas, como o *M. kansasii*, *Complexo M. terrae* ou *M. szulgai*, os quais são nitrato-redutase positivos (Martin *et al.* 2005; Brasil 2008).

Recentemente o teste de redução de nitrato modificado para ensaio de suscetibilidade às drogas anti-tuberculosas de primeira e de segunda linha para TB, foi incluído como metodologia para avaliação de resistência a drogas anti-TB pela OMS (WHO 2010). Porém, no Brasil, como o teste de redução do nitrato ainda não é realizado na rotina laboratorial, não há dados publicados sobre o percentual de isolados de *M. tuberculosis* nitrato-redutase negativos, situação que pode vir a interferir na interpretação dos resultados sobre resistência medicamentosa.

Pelo exposto, torna-se indispensável realizar a avaliação do perfil de redução do nitrato de isolados previamente identificados como *M. tuberculosis*, como etapa preliminar para a implantação do método de redução de nitrato modificado para ensaio de suscetibilidade às drogas anti-tuberculosas de primeira e segunda linhas, na cidade de Manaus, que possui elevado coeficiente de incidência de TB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo de Estudo

Trata-se de estudo laboratorial do tipo descritivo, no qual foi avaliada a redução do nitrato em isolados clínicos de *M. tuberculosis*, identificados pelo Laboratório de Micobacteriologia/INPA, e armazenados em freezer -70°C no acervo de Micobactérias do INPA durante os anos de 2007 a 2009.

2.2 Universo de Estudo

2.2.1 Cepas Controle e isolados de *M.tuberculosis* analisados

Para o controle positivo dos testes foi utilizada a cepa padrão de *M. tuberculosis* - H37Rv, a qual apresenta crescimento lento, formação de colônias não pigmentadas, e positividade na produção de niacina e na redução de nitrato. Os isolados de *M. tuberculosis* que foram avaliados estavam armazenados em criotubos contendo miçangas e foram provenientes de amostras clínicas de escarro cujos doadores autorizaram seu uso em atividades de identificação. Nas identificações anteriores, os isolados apresentaram a característica de crescimento lento, de colônias não pigmentadas, com resultados positivo ao teste de niacina. Estes estavam mantidos à temperatura de -70°C, e depositados no acervo de Micobactérias/INPA.

2.3 Fluxo de Atividades

O fluxo das atividades desenvolvidas está apresentado na Figura 1, e detalhado nas próximas seções.



Figura 1. Fluxo de atividades para avaliação do comportamento fenotípico de redução do nitrato em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*.

2.4 Detalhamento dos Procedimentos

2.4.1 Reativação dos isolados

De cada criotubo, contendo o isolado de *M. tuberculosis*, foram retiradas 2 miçangas e transferidas para tubo de ensaio contendo 1 mL de água destilada estéril e 4 pérolas de vidro estéreis. O tubo foi submetido à agitação em vórtex por 2 minutos, para desagregação e homogeneização da suspensão bacilar, que foi em seguida, inoculada em 2 tubos contendo meio de cultivo Löwenstein-Jensen (L-J), sendo 0,2 mL em cada tubo. Em paralelo, como tubo de controle de reativação, foi realizada a semeadura direta de uma miçanga na superfície do meio, sem diluição prévia do conteúdo da mesma. Todos os tubos foram incubados em estufa à 37°C, sendo realizada leitura semanal durante 21 dias, período esse necessário para que fossem obtidas unidades formadoras de colônia (UFC) em fase exponencial de desenvolvimento, e apropriadas para o repique.

2.4.2 Repique de cepas controle e de isolados micobacterianos

Uma porção de cada amostra, contendo aproximadamente 5 mg de massa bacilar, foi retirada com auxílio de alça descartável estéril e inoculada em tubo contendo 1 mL de água destilada e 4 pérolas de vidro. Para a desagregação e homogeneização da massa bacilar, o tubo foi agitado em vórtex por um período de 2 minutos. Uma alíquota da suspensão foi semeada em dois tubos contendo meio de cultivo de L-J, em quantidade de 0,2 mL/tubo, os quais foram então incubados em estufa a 37°C por 21 dias. Após esse período, em um dos tubos realizou-se o teste de produção de niacina e o outro serviu para a obtenção de massa bacteriana necessária para a realização do teste de redução do nitrato.

2.4.3 Teste de Produção da Niacina

O teste de produção da niacina foi realizado para confirmação dos resultados originais, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil 2008). A técnica utilizada foi a descrita por David et al. (1989).

2.4.4 Teste de Redução do Nitrato

O teste de redução do nitrato foi realizado de acordo com o recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil 2008). Para tanto, foram preparados os reagentes: substrato de nitrato de sódio 22 mM - pH 7,0, e os reagentes de revelação do teste redução do nitrato (reagentes A, B e C). O reagente A é composto por solução de HCl 50 mL e água destilada estéril 50 mL. O reagente B, por sulfanilamida 0,2 g adicionada a 100mL de água destilada estéril. E o reagente C, por 0,1g de hidrocloreto de N-naftiletildiamina dissolvido em 100 mL de água destilada estéril.

- Leitura: Foi realizada de acordo com escala colorimétrica apresentada no Quadro 1.

COR	INTENSIDADE DA COR
Rosa Pálido	+/-
Rosa Claro	1+
Rosa Escuro	2+
Vermelho	3+
Vermelho escuro	4+
Vermelho arroxeadado	5+

Quadro 1. Escala de leitura colorimétrica de interpretação do teste de redução do nitrato.

Teste positivo → intensidade entre 3+ a 5+.

Teste negativo → intensidade entre +/- a 2+.

2.5 Análise dos resultados

Para a verificação do perfil de produção de nitrato-redutase, entre os isolados positivos ao teste de redução do nitrato, os percentuais foram determinados de acordo com a razão entre o número de positivos nos níveis 3+, 4+ e 5+ da escala colorimétrica, respectivamente, e o número total de isolados positivos. A análise foi efetuada em Tabela 2 X 2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram reativados 41/41 isolados de *M. tuberculosis* depositados no ano de 2007, 2008 e 2009. Todos os 41 isolados foram submetidos à análise fenotípica de produção de niacina e redução do nitrato. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Produção de niacina e redução do nitrato observados isolados obtidos nos anos de 2007 a 2009.

Produção de Niacina	Redução do Nitrato		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	41	0	41
Negativa	0	0	0
Total	41	0	41

Pelos resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se que houve 100% de positividade no teste de redução do nitrato no grupo de cepas testadas. Recentemente o teste de redução do nitrato modificado para o ensaio de suscetibilidade às drogas anti-tuberculosas de primeira e segunda linha para TB, foi incluído como metodologia para avaliação de resistência a drogas anti-tuberculosas pela OMS (WHO 2010). Desta forma, estes resultados favorecem a implementação do referido método em nosso meio, visto a inexistência de cepas de *M. tuberculosis* nitrato-negativo.

Dentre os 41 isolados de *M. tuberculosis* nitrato-positivos, 19 (46,4%) apresentaram intensidade colorimétrica de 3+, 16 (39%) apresentaram intensidade de 4+, e 6 (14,6%) intensidade de 5+.

4. CONCLUSÕES

Quarenta e um isolados de *M. tuberculosis* apresentaram positividade ao teste de redução do nitrato. Estes dados confirmam que o método de redução de nitrato modificado para ensaio de suscetibilidade às drogas anti-tuberculosas de primeira e segunda linha, pode ser utilizado em isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes residentes na cidade de Manaus.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil 2008. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias*. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde.

David, H.L *et al.* 1989. *Méthode de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Paris: Institut Pasteur.

Martin, A. 2005. Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 63: 145–150.

WHO, 2010. Framework for Implementing new tuberculosis Diagnostic. 1-24 (www.tb-evidence.org/documents/policies/whopoliciesframework_july2010) Acesso em: 18/02/2011.