

Influência da qualidade das culturas de *Mycobacterium tuberculosis* nos resultados negativos dos testes da pirazinamidase

Influence of *Mycobacterium tuberculosis* cultures quality conditions on negative results on pyrazinamidase testing

RIALA6/1126

Jonas Umeoka YAMAUCHI¹, Marina Shinobu HAYASHI¹, Suely Yoko Mizuka UEKI¹, Carmen Maria Saraiva GIAMPAGLIA¹, Rosângela Siqueira OLIVEIRA¹, Fábio Oliveira LATRILHA¹, Maria Alice da Silva TELLES¹, Maria Conceição MARTINS^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, SP. Seção de Bacteriologia, Setor de Micobactérias. Av. Dr. Arnaldo, nº 351 9º andar, CEP01246-902, São Paulo/SP, e-mail: mcmartin@ial.sp.gov.br
Recebido: 28/03/2007 – Aceito para publicação: 01/06/2007.

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde recomenda o uso do teste da pirazinamidase (PZAse) como método alternativo para determinação da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à pirazinamida, por ser um teste rápido e de fácil execução. Foram objetivos deste estudo: verificar a reprodutibilidade dos resultados negativos do teste da pirazinamidase quando realizado a partir das culturas originais e de seus subcultivos e relacioná-los com a qualidade das culturas originais e com os perfis de suscetibilidade à estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R) e etambutol (E). Foram analisadas 115 culturas de *Mycobacterium tuberculosis* cujos cultivos originais apresentaram resultados negativos no teste da PZAse, o que representa resistência à pirazinamida. A qualidade das culturas foi avaliada, anotada e um segundo teste foi realizado a partir de subcultivos jovens e abundantes. A concordância entre os resultados do primeiro e do segundo teste foi de 72,2% e a qualidade das culturas mostrou correlação com os resultados ($p < 0,001$). O teste da pirazinamidase é útil quando utilizado juntamente com técnicas de detecção de suscetibilidade às drogas S,I,R,E, desde que seja realizado a partir de cultivos com boa qualidade, que permitam a utilização de inóculo abundante.

Palavras-chave. *Mycobacterium tuberculosis*, pirazinamidase, resistência às drogas, qualidade da cultura.

ABSTRACT

The pyrazinamidase is a fast and easy to perform assay, recommended by the World Health Organization as an alternative technique to determine pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. This study aimed to assess the reproducibility of negative results on pyrazinamidase assay using both primary cultures and respective subcultures, and to correlate them with original cultures quality, as well as their susceptibility profile to streptomycin (S), isoniazid (I), rifampin (R) and ethambutol (E). A total of 115 *Mycobacterium tuberculosis* cultures were analyzed, which the original growth produced negative results on pyrazinamidase assay, implying a resistance to pyrazinamide. The cultures quality was assessed and recorded; a second testing was performed using recent and abundant subcultures. Results from the first and the second tests demonstrated an agreement rate of 72.2%, and the cultures quality showed correlation with the results ($p < 0.001$). Pyrazinamidase testing is useful when it is combined with other techniques for analyzing mycobacteria susceptibility to S, I, R, E since it is performed with high quality cultures which allow the use of abundant inocula.

Key words. *Mycobacterium tuberculosis*, pyrazinamidase, drug resistance, culture quality.

INTRODUÇÃO

Na fase inicial do regime de tratamento da tuberculose, a isoniazida e a rifampicina têm como função a eliminação rápida de bacilos ativos e a pirazinamida a destruição dos bacilos semidormentes situados no interior dos macrófagos. Como são poucas as drogas eficientes, disponíveis para o tratamento da tuberculose, o surgimento de resistência a uma dessas drogas pode representar o desenvolvimento de doença potencialmente sem tratamento. A multidroga resistência (MDR), que é a resistência simultânea do *M. tuberculosis* à isoniazida e rifampicina, é preocupante, pois essas duas drogas representam a mais potente combinação contra o bacilo da tuberculose.

A detecção bacteriológica da resistência às drogas, além de permitir o monitoramento dos pacientes com tuberculose, é uma das ferramentas de avaliação do Programa de Controle da Tuberculose.

O monitoramento da resistência à pirazinamida, feito simultaneamente às demais drogas, requer um procedimento mais complexo. No Brasil, o método amplamente utilizado para detecção dessa resistência é o das proporções, que além de exigir a acidificação do meio Löwenstein-Jensen para promover a atividade da pirazinamida, tem sua eficácia limitada pelo longo tempo de crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*, que é de aproximadamente 30 dias¹.

Em 1986 a Organização Mundial da Saúde-OMS² indicou a detecção da enzima pirazinamidase (PZase) como método alternativo ao das proporções, por ser mais simples e rápido.

As cepas de *M. tuberculosis* suscetíveis à pirazinamida apresentam atividade da pirazinamidase (PZase), enzima que converte a pirazinamida em ácido pirazinóico (POA) que é bactericida para essa espécie. A pirazinamidase é codificada pelo gene *pncA* e diversos estudos têm demonstrado que a mutação desse gene leva à ausência de atividade da enzima e, conseqüentemente, resistência à pirazinamida^{3,4,5,6,7,8}.

Shikama et al⁹, em estudo piloto para implantação da técnica da PZase em Sorocaba/São Paulo, demonstraram sensibilidade de 96,4% e especificidade de 87,9% ao compararem os resultados obtidos com esta técnica e com o método das proporções. Os autores relataram que a técnica é de fácil execução e que possibilita o fornecimento do resultado após quatro dias de incubação. No entanto, deve-se ter o cuidado de utilizar inóculo bacilar abundante, proveniente de cultivos em fase exponencial de crescimento^{2,9}, para evitar resultados falso-negativos no teste da PZase que indicariam resistência à pirazinamida.

Há estudos demonstrando a associação estatística entre a qualidade das culturas de *M. tuberculosis* e os resultados dos testes de identificação e de suscetibilidade às drogas^{8,10}. Zhang et al⁸ relataram diferenças de resultados dos testes da resistência à PZA efetuados com subcultivos de uma mesma cultura, em dois momentos diferentes, após duas *semanas de crescimento* e após dois meses de crescimento. Martins et al.¹⁰ verificaram que a qualidade inadequada de cultivos, seja por utilização de meios de cultura com validade

expirada ou por incubação prolongada, interfere nos resultados dos testes de suscetibilidade às drogas.

O Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz recebe culturas de micobactérias dos laboratórios de Saúde Pública do estado de São Paulo, para a realização dos testes de identificação das espécies e de suscetibilidade às drogas. Para agilizar a liberação dos resultados, os testes são realizados a partir das culturas originais (independentemente da qualidade da mesma), desde que contenham massa bacilar suficiente e que não apresentem contaminação por outros microrganismos.

Foram objetivos deste estudo: verificar a reprodutibilidade dos resultados do método da PZase, quando realizado a partir das culturas originais e de seus subcultivos, e relacioná-los com a qualidade das culturas originais e com os perfis de suscetibilidade à estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R) e etambutol (E).

MATERIAL E MÉTODOS

Entre janeiro de 2003 e dezembro de 2004, cepas de *M. tuberculosis* recebidas pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz foram submetidas ao teste de suscetibilidade à pirazinamida, pela detecção da atividade da enzima pirazinamidase^{2,11}. O teste da pirazinamidase é realizado em meio de ágar adicionado de caldo Dubos, piruvato de sódio e pirazinamida distribuído, na quantidade de 5ml, em tubos com tampa de rosca (16X125mm) e solidificado na posição vertical. Após quatro dias da inoculação de massa bacilar abundante e incubação a 37°C pode-se evidenciar, pela revelação com solução de sulfato de ferro amoniacal, a presença de ácido pirazinóico na forma de um anel rosa na superfície do meio. A presença do ácido pirazinóico indica que o bacilo foi capaz de hidrolizar a pirazinamida e portanto, é suscetível a essa droga.

Nesse período, todas as culturas originais que apresentaram resultados negativos no teste da pirazinamidase (indicação de resistência à pirazinamida) foram subcultivadas em meio de Löwenstein-Jensen, para repetição do teste. De cada uma dessas culturas foram anotados o resultado do teste de suscetibilidade às drogas S,I,R,E e a avaliação da qualidade da cultura efetuada na data de recebimento, levando em conta os aspectos microscópicos e macroscópicos do crescimento em frascos padronizados quanto ao tamanho e quantidade de meio de cultura. O crescimento e o meio de cultura foram avaliados de acordo com o proposto por Martins et al¹⁰ como segue: Boa = crescimento adequado, em frasco com capacidade para 30ml com 15ml de meio ou em tubo de 16 ou 18X180mm com 6-8ml de meio de qualidade adequada; Regular = crescimento adequado em frascos com meios adequados, mas com quantidade de meio menor que a recomendada; Inadequada = crescimento insuficiente, em meio ácido ou alcalino, ou seco, ou em frascos com presença de água de condensação ou de outros microrganismos.

Todos os resultados foram armazenados em um banco de dados no Epi-info 6, para análise posterior.

RESULTADOS

Foram incluídas no estudo 115 culturas de *M. tuberculosis*, recebidas dos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo, que apresentaram resultado negativo no teste da pirazinamidase.

Na avaliação da qualidade, essas culturas foram classificadas como: Boa = 32 (27,8%), Regular = 43 (37,4%) e Inadequada = 40 (34,8%). No segundo teste da pirazinamidase, efetuado com o

crescimento obtido no subcultivo, 83 (72,2%) confirmaram o primeiro resultado e 32 (27,8%) discordaram por apresentarem atividade da enzima.

A avaliação da qualidade das culturas originais e a correlação com o resultado da pirazinamidase, estão demonstradas na Tabela 1.

Da Tabela 2, constam o perfil de suscetibilidade às drogas S, I, R, E e os resultados do primeiro e do segundo teste da pirazinamidase.

Tabela 1. Qualidade das culturas originais e resultados de dois testes da pirazinamidase realizados com as culturas originais e com seus subcultivos.

Qualidade da cultura original	Pirazinamidase				Total Nº
	Testes concordantes: 1º (-) 2º (-)		Testes discordantes: 1º (-) 2º (+)		
	Nº	%	Nº	%	
Boa	26	81,2	6	18,8	32
Regular	36	83,7	7	16,3	43
Inadequada	21	52,5	19	47,5	40
Total	83	72,2	32	27,8	115

Boa= crescimento adequado, em frasco com capacidade para 30ml com 15 ml de meio ou em tubo de 16 ou 18X180mm com 6-8ml de meio de qualidade adequada, Regular= crescimento adequado em frasco e meios adequados, com quantidade de meio menor que a recomendada, Inadequada= crescimento insuficiente, em meio ácido ou alcalino ou seco ou em frascos com presença de água de condensação ou contaminantes.

(-) = resultado negativo (ausência de pirazinamidase-pirazinamida resistente)

(+) = resultado positivo (presença de pirazinamidase-pirazinamida sensível)

Nº = número, %= porcentagem

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade às drogas S, I, R, E e resultados de dois testes da pirazinamidase realizados com as culturas originais e com seus subcultivos.

Perfil de suscetibilidade às drogas S,I,R,E		Pirazinamidase				Total Nº	
		Testes concordantes:		Testes discordantes:			
		1º (-)	2º (-)	1º (-)	2º(+)		
		Nº	%	Nº	%		
Suscetíveis	MDR		4	16,0	21	84,0	25
		IR	36	92,3	3	7,7	39
		IRE	15	83,3	3	16,7	18
		SIR	10	100,0	0	0,0	10
		SIRE	13	92,8	1	7,2	14
Outras resistências		5	55,6	4	44,4	91	
Total		83	72,2	32	27,8	15	

Nº = número, %= porcentagem

(-) = resultado negativo (ausência de pirazinamidase-pirazinamida resistente)

(+) = resultado positivo (presença de pirazinamidase-pirazinamida sensível)

S = estreptomicina, I=isoniazida,, R= rifampicina, E= etambutol

MDR = multidroga resistência (resistência simultânea a pelo menos isoniazida e rifampicina.)

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A concordância dos resultados do primeiro teste feito com a cultura original e do segundo feito com o subcultivo foi de 72,2%, o que demonstra boa reprodutibilidade da técnica.

Na Tabela 1 observa-se que a porcentagem de discordância entre os resultados dos dois testes foi de 47,5% quando as culturas originais foram classificadas como inadequadas. Nesse caso, a atividade da enzima só foi evidenciada por ocasião do segundo teste, feito com o subcultivo de boa qualidade.

Neste estudo observou-se correlação entre a qualidade das culturas e os resultados dos testes de pirazinamidase ($p < 0,001$) confirmando as observações de estudos anteriores sobre a influência da qualidade de culturas originais nos testes de suscetibilidade às drogas^{8,10}.

A análise dos resultados dos testes de pirazinamidase comparados com o perfil de suscetibilidade às drogas (S,I,R,E), apresentados na Tabela 2, mostrou que a maioria (84%) dos resultados discordantes ocorreu com as cepas suscetíveis às drogas. Entre as cepas MDR ou com outro tipo de resistência, a concordância dos resultados dos dois testes foi alta (87,8%). Essas observações alertam para o fato de que as cepas submetidas ao teste de suscetibilidade às drogas, que se revelem resistentes apenas à pirazinamida (sem atividade da pirazinamidase), devem ser subcultivadas e ter o teste repetido para confirmação dessa resistência.

Esta técnica, rápida e de fácil execução, possibilita a obtenção dos resultados no curto prazo de quatro dias de incubação sendo um bom método alternativo aos convencionais que, além de necessitarem meios com pH ácido para ação da pirazinamida, necessitam de um período de incubação mais longo.

Concluimos que a técnica é útil para uso conjunto com os métodos de detecção de suscetibilidade às drogas S, I, R, E mas, sugerimos que os resultados de resistência à PZA sejam confirmados com a repetição do teste feito a partir de inóculos abundantes provenientes de cultivos jovens.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3ª ed. Edição comemorativa. Rio de Janeiro. 2005. 240p
2. OPAS-OMS. Manual de normas y procedimientos tecnicos para la bacteriologia de la tuberculosis. Parte III. Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas. La identificación de micobactérias. Nota técnica 28. Buenos aires, Argentina: Centro Panamericano de Zoonosis, 1986.
3. Aono A, Hirano K, Hamasaki S, Abe C. Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA): compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 347-52.
4. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3): 528-32.
5. Miyagi C, Yamane N, Yogesh B, Ano H, Takashima T. Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48:111-6.
6. Rodrigues VFS, Telles MA, Ribeiro MO, Cafrune PI, Rossetti MLS, Zaha A. Characterization of *pncA* Mutation in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brasil. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 444-6.
7. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 540-3.
8. Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol* 2002; 51:42-9.
9. Shikama ML, Farrapo ACX, Nogueira CF, Silva RFM, Sousa MS, Pini MIT, Amorim ABR, Errera MC, Sato DN. Avaliação preliminar da suscetibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* à pirazinamida pela detecção da pirazinamidase. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2002; 12(2): 11.
10. Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Credidio RA, Butuem IV, Ferrazoli L. Impacto da qualidade das culturas de micobactérias no resultado dos testes de identificação das espécies e de suscetibilidade às drogas. *News Lab* 2003; 58:70-8.
11. Collins CH, Grange JM, Yates MD. *Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice*, London: Butterworth Heinemann 2nd ed. 1997. 139p.