

Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Evaluation of the use of microtitre plate technique to determine the minimal inhibitory concentration of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis* strains

Maria Alice S. TELLES^{1*}
Alessandra MOSCA¹

RIALA6/877

Telles, M.A.S.; Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):16-19, 2000

RESUMO. A técnica de microdiluição em placa, para determinação da concentração inibitória mínima, foi comparada com as técnicas de macrodiluição em tubo e radiométrica. A padronização da microtécnica visou sua utilização em ensaios de drogas alternativas e novos compostos com potencial ação antimicrobiana contra o *Mycobacterium tuberculosis*. A droga utilizada, isoniazida, foi testada na cepa padrão H₃₇R_a e em 34 cepas de teste, sendo 26 sensíveis a isoniazida e oito resistentes, segundo perfil de sensibilidade determinado pelo método da taxa de resistência. A comparação entre os métodos em placa e o radiométrico resultou na concordância de 32 cepas e discordância de três. Estes dados indicam que o método de microdiluição em placa é adequado para se testar o efeito de drogas ou compostos químicos sobre o *M. tuberculosis*. A técnica é econômica, de fácil execução e não requer equipamento para sua execução.

PALAVRAS-CHAVE. Concentração inibitória mínima; *Mycobacterium tuberculosis*; resistência a drogas; microdiluição em placa.

INTRODUÇÃO

A tuberculose, apesar de ser uma das doenças mais antigas que acometem o homem, tem apresentado novos desafios ao mundo moderno, de modo que novas metodologias precisam ser desenvolvidas para serem aplicadas pelos laboratórios.

Atualmente, o que mais preocupa as autoridades de saúde em relação à tuberculose é a questão da resistência às drogas correntemente utilizadas no tratamento.

Os métodos laboratoriais convencionais de determinação da sensibilidade às drogas das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* demandam um tempo excessivo para a obtenção do resultado. Por outro lado, os métodos mais modernos e eficientes como, por exemplo, o método radiométrico^{1,2,3,4,5} e Mycobacteria Growth Indicator Tube⁶, apresentam custo elevado inviabilizando sua utilização de maneira ampla e descentralizada, especialmente em países pobres onde a tuberculose e, freqüentemente, o problema da resistência são mais agudos e com maior amplitude.

¹ Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central – Seção de Bacteriologia – Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo – SP

A necessidade de novas drogas ativas é urgente e tem causado renovado interesse, tanto em testar moléculas derivadas de tuberculostáticos já conhecidos⁷, quanto na busca de novas substâncias isoladas de extratos de vegetais⁸ ou de fermentação microbiana.

O Brasil, com sua enorme biodiversidade, apresenta grande potencial para a descoberta de novas moléculas ativas em micobactérias e outros agentes infecciosos. A quantidade de substâncias candidatas a serem uma nova droga para tratamento da tuberculose é enorme. Desta forma, será importante a utilização de um teste para esta triagem que apresente rapidez, simplicidade e que seja padronizado, além de condizente com as condições de infra-estrutura do país.

Por não haver método convencional padronizado para as novas drogas, ou mesmo para algumas das drogas alternativas do tratamento da tuberculose, é que a utilização de metodologia que determine a concentração inibitória mínima (CIM) é a mais indicada.

O método de determinação de CIM por microdiluição em placa tem sido empregado para determinar o perfil de resistência de micobactérias a antimicrobianos. Em decorrência da simplicidade tecnológica e baixo custo, o teste contém alto potencial de utilização universal^{9,10,11,12}.

O objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica de microdiluição em placa, visando sua utilização em ensaios de drogas alternativas e novos compostos contra o *Mycobacterium tuberculosis*, bem como sua comparação com os métodos radiométrico e macrodiluição, em tubo, já padronizados, e que utilizam meio líquido¹³.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismos

Foram utilizadas, para os testes, a cepa padrão avirulenta, de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_a (ATCC25177) e 34 cepas de *M.tuberculosis* de isolamentos clínicos realizados no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz. As cepas possuíam seu perfil de sensibilidade a isoniazida previamente determinado pelo método da taxa de resistência, método convencional em meio sólido, tendo sido incluídas 26 sensíveis e oito resistentes. A cepa padrão também mostrou-se sensível. A partir de culturas em meio sólido Lowenstein-Jensen, as cepas foram cultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 adicionado de enriquecimento Albumina-Dextrose-Catalase (ADC), incubada a 37°C por 7 dias. A padronização do inóculo foi obtida por novo subcultivo em meio líquido Middlebrook 7H9, sendo o crescimento bacteriano medido diariamente em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 540 nm, até que a suspensão bacteriana atingisse leitura equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônias. A suspensão resultante foi diluída a 1:10 e 1:100 com água destilada, sendo as duas diluições utilizadas como suspensão padronizada para inoculação nas três técnicas testadas.

2. Antimicrobiano

A isoniazida (INH) foi utilizada como agente inibitório do crescimento bacteriano, nas concentrações de: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 µg/ml.

3. Definição da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

A CIM foi definida como a menor concentração da droga na qual não se observou crescimento bacteriano. A cepa foi considerada sensível à isoniazida quando apresentou CIM menor do que 0,2 µg/ml.

3.1 Método clássico de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) em meio líquido

Empregou-se a técnica descrita por Ericsson e Sheris¹³ sendo utilizados tubos com 5 ml de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC contendo as diferentes concentrações de INH, bem como tubos controles sem INH. Os tubos foram inoculados com 0,5 ml da suspensão bacteriana padronizada. A leitura foi realizada pela verificação visual do crescimento bacteriano após 17 dias de incubação a 37°C.

3.2 Método de determinação de CIM em placa de microdiluição

Em placas estéreis de 96 orifícios foram distribuídos 100 µl de meio Middlebrook 7H9¹⁰. Na linha A da placa foi adicionado 100 µl de uma solução INH com concentração de 3,2 µg/ml. Em seguida, com uma pipeta de microdiluição de 12 canais foram feitas as diluições seriadas, transferindo-se 100 µl da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até a linha G da placa, sendo que a última linha H foi deixada sem droga, utilizada como controle do crescimento bacteriano. Foram inoculados 10 µl da suspensão bacteriana padronizada em cada um dos orifícios da placa. A placa foi selada com um filme selador, e incubada por 20 dias e a leitura feita visualmente.

3.3 Método de determinação de CIM utilizando o método radiométrico

A técnica utilizada é a descrita por Siddiqi, S.H. et al.³. A partir de uma solução de Isoniazida 1% foram feitas diluições até obter as concentrações necessárias para que ao se adicionar ao frasco de meio 7H12 (BACTEC 12B, Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Sparks, Md), que contém 4 ml de meio, fosse atingida a concentração final desejada. Aos tubos contendo 4 ml de 7H12 foram adicionados 0,1 ml de solução de INH. Em cada frasco de meio 7H12 foi inoculado 0,1 ml da suspensão bacteriana padronizada. O frasco foi incubado a 37°C e a leitura em equipamento BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Sparks, Md) foi feita diariamente, sendo o crescimento expresso em índice de crescimento (GI). Por esta técnica está padronizado que quando o GI atinge valores entre 400 e 600, a suspensão bacteriana pode ser então empregada para a realização de testes de avaliação de efeito de antimicrobianos. Os frascos contendo INH foram inoculados com 0,1 ml desta suspensão

bacteriana e também em um frasco sem droga que foi utilizado como controle do crescimento bacteriano. O controle foi inoculado com a suspensão bacteriana diluída 1:100. Os frascos foram incubados a 37°C e as leituras feitas no equipamento BACTEC diariamente, a partir do terceiro dia de incubação, até que o frasco controle apresentasse leitura de GI igual a 30. No dia que o GI atinge o valor maior ou igual a 30, calcula-se o Δ GI, sendo o Δ GI calculado com dados do dia anterior³.

3.4 Método de determinação de CIM utilizando corante Alamar Blue

Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 orifícios preparadas de maneira similar ao método de determinação de CIM⁹. O crescimento de *M.tuberculosis* foi detectado após a adição de um corante indicador de óxido redução, o Alamar Blue⁹. Neste método, a placa é preparada de modo que cada orifício contém um total de 200 µl da mistura de meio de cultura, droga e suspensão bacteriana. Após 15 dias de incubação, foi adicionado a cada orifício 25 µl de Alamar Blue, preparado em solução 1:1 de tween 80 a 10%. A placa foi reincubada por 24 horas, sendo, então, observado o aparecimento de cor. Nos orifícios cuja cor do corante mudou para rosa o teste foi considerado positivo e negativo se a cor permaneceu azul.

RESULTADOS

As oito cepas resistentes pelo método convencional apresentaram-se resistentes nos métodos de placa e radiométrico, enquanto que no método em tubo 6 cepas tiveram resultado discordante. Das 27 cepas sensíveis, duas tiveram resultado discordante no método de placa, apresentando concentrações inibitórias mínimas maior ou igual a 0,2 µg/ml, enquanto que os métodos radiométrico e de tubo apresentaram uma cepa discordante.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados das concentrações inibitórias mínimas obtidas nos três métodos testados, mostrando que:

- a comparação dos resultados dos métodos em placa e radiométrico evidenciou 32 cepas concordantes e três discordantes, enquanto que a microdiluição quando comparada com a macrodiluição resultou em 26 cepas concordantes e 9 discordantes.
- o método radiométrico em comparação ao método em tubo apresentou 27 resultados concordantes e 8 discordantes.

A avaliação de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo dos métodos testados em relação ao método convencional estão apresentados na Tabela 2.

A Figura 1 apresenta a comparação dos resultados de CIM entre os métodos radiométrico e de placa, mostrando boa correlação entre os dois métodos.

A análise do tempo decorrido, para cada teste, na obtenção de resultado, mostrou que o método radiométrico foi o mais rápido, requerendo sete dias, sendo que para os métodos em

tubo e em placa foram necessários 17 e 20 dias respectivamente.

A utilização do corante Alamar Blue melhorou a visualização do crescimento bacteriano, e os resultados obtidos com e sem adição do Alamar Blue foram concordantes.

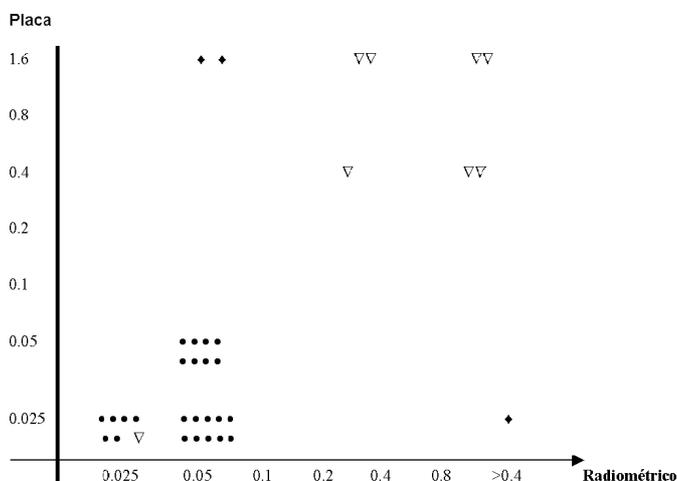
Tabela 1. Comparação das Concentrações Inibitórias Mínimas (µg/ml) da Isoniazida, de cepas sensíveis e resistentes, obtidas nos três métodos

cepas sensíveis n = 27				cepas resistentes n = 8			
n° cepas	placa	radiom.	Tubo	n° cepas	placa	radiom.	tubo
8	0,050	0,050	0,050	1	1,600	0,400	<u>0,10</u>
4	0,025	0,025	0,025	2	1,600	>0,400	<u>0,05</u>
5	0,025	0,050	0,025	1	1,600	0,400	<u>0,05</u>
2	0,025	0,025	0,050	1	0,025	0,025	<u>0,10</u>
2	0,025	0,050	0,050	1	0,400	>0,400	0,80
2	0,025	0,050	0,100	1	0,400	>0,400	0,40
1	0,025	0,050	<u>0,200</u>	1	0,400	0,400	<u>0,05</u>
1	<u>1,600</u>	0,025	0,050				
1	<u>1,600</u>	0,050	0,050				
1	0,025	<u>>0,400</u>	0,025				

Valores grifados indicam discordância de valores em relação aos outros métodos

Tabela 2. Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo dos métodos de placa, radiométrico e tubo em relação ao método convencional

	Placa	Radiométrico	Tubo
Sensibilidade	93	96	93
Especificidade	86	87	25
Valor preditivo positivo	96	96	81



- ▽ cepas resistentes pelo método convencional
- cepas sensíveis pelo método convencional
- ◆ cepas com resultados discordantes entre os métodos radiométrico e em placa

Figura 1. Comparação das Concentrações Inibitórias Mínimas de Isoniazida obtidas nos métodos de placa e radiométrico

DISCUSSÃO

A necessidade de padronização de um teste simples e econômico para determinação de concentração inibitória mínima de novas drogas e de drogas alternativas ao tratamento de primeira linha da tuberculose, e de novas moléculas ativas com potencial atividade sobre o *M. tuberculosis*, nos levaram a avaliar o método de microdiluição em placa, comparando-o com o método convencional e padronizado para determinação de sensibilidade às drogas, o método da taxa de resistência. Como o método em placa utiliza meio líquido, havia a necessidade de ser comparado, portanto, com métodos padronizados que utilizassem meio líquido, e por esta razão foi comparado com os métodos radiométrico e o de diluição em tubo.

A avaliação da sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo evidenciaram que os métodos de placa e radiométrico apresentam valores muito equivalentes, sendo que o método em tubo apresentou desempenho insuficiente nos valores de especificidade e de valor preditivo positivo. Os valores de sensibilidade mostraram-se altos para os três métodos, 93 a 96%, no entanto os valores de especificidade foram mais baixos, 86% para placa, 87% para radiométrico, sendo que o método em tubo apresentou valor de especificidade extremamente baixo, 25%. O valor preditivo positivo foi muito bom para os métodos em placa e radiométrico (96%) e baixo para o método em tubo (81%). O coeficiente de Kappa, calculado para o método em placa foi de 0,70 recebendo a classificação de substancial e para o método radiométrico o coeficiente apresentou o valor de 0,84 recebendo a classificação de quase perfeito. Esta análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa EPI-INFO, versão 6.04b (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, E.U.A.)

Por esta análise conclui-se que os métodos em placa e radiométrico são os que apresentaram melhores resultados, sendo que em relação às discordâncias, os dois métodos foram totalmente comparáveis, o método radiométrico resultou em dois discordantes e o de placa três.

O método em tubo, além de ser muito trabalhoso, acarreta erros maiores de diluição das drogas, e os resultados mostraram menor concordância.

Os métodos radiométrico e em placa mostraram-se mais adequados para a determinação de CIM. No entanto o radiométrico apresenta custo elevado para as condições laboratoriais de países em desenvolvimento, exigindo, ainda, equipamento específico, fator limitante em muitos laboratórios. Além disso, utiliza materiais importados e radioativos, acarretando dificuldades de aquisição e descarte dos mesmos.

O método em placa apresenta várias vantagens como: baixo custo, não exigir equipamento específico para sua realização e não utilizar material importado ou radioativo.

O método radiométrico, no presente estudo, apresentou um tempo de obtenção do resultado reduzido em 10 dias em relação ao método em placa.

Apesar de outros estudos mostrarem que os resultados utilizando-se o método em placa podem ser obtidos em 7 a 10 dias^{9,10}, no presente trabalho o retardamento no crescimento bacteriano ocasionou um acréscimo de dias para a obtenção dos resultados. Isto pode ser devido à característica intrínseca do *Mycobacterium tuberculosis*, que apresenta tempo de crescimento em meio de cultura bastante variável.

Os dados obtidos neste estudo indicam que o método de microdiluição em placa é adequado para determinação da CIM, testar a sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* frente a diferentes drogas e principalmente é prático e econômico, podendo ser utilizado em larga escala em laboratórios de países com baixos recursos tecnológicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

RIALA6/877

Telles, M.A.S.; Mosca, A. Evaluation of the use of microtitre plate technique to determine the minimal inhibitory concentration of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2): 15-19, 2000

ABSTRACT. The microtitre plate method used to determine the minimal inhibitory concentration has been compared with the method of tube macrodilution and the radiometric method, for the purpose of evaluating this method in testing second-line drugs and new compounds which may have a potential effect against *Mycobacterium tuberculosis*. The drug used was isoniazid and 34 strains were tested, besides the standard strain H₃₇R₆. Out of those strains, 26 were sensitive to isoniazid and eight were resistant to it. The results obtained showed that the plate method gave 32 concordant results and three discordant ones. There was a good correlation between the results of these methods and the results of the radiometric method. The sensitivity and specificity of this method were good, being very similar to the ones for the radiometric method. The conclusion is that the microdilution plate method is appropriate to test the effect of drugs or

compounds against *M.tuberculosis*. It is an inexpensive technique that is easy to perform and does not require any equipment in its use.

KEY WORDS. Minimal inhibitory concentration; *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance.

REFERÊNCIAS

1. Inderlied, C.B; Salfinger, M. Antimicrobial agents and susceptibility tests: mycobacteria. In: Murray, P.R. et al. (ed), **Manual of Clinical Microbiology**. 6th ed. Washington : ASM Press, 1995. p.1385-1404.
2. Roberts, G.D. et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 18: 689-696, 1983.
3. Siddiqi, S.H.; Libonati, J.P.; Middlebrook, G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 13: 908-912, 1981.
4. Siddiqi, S.H.; Hawkins, J.E.; Laszlo, A. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. **J. Clin. Microbiol.**, 22: 919-923, 1985.
5. Snider, D.E. et al. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 123: 402-406, 1981.
6. Palaci, M. et al. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 762-764, 1996.
7. Sato, D.N. **Avaliação da atividade microbiana "in vitro" de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis***. São Paulo, 1998. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
8. Cantrel, C.L. et al. Antimycobacterial activity of crude plant extracts from South, Central and North America. **Phytomedicine.**, 5(2): 137-45, 1998.
9. Franzblau, S.G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 362-366, 1998.
10. Collins, L.A.; Franzblau, S.G. Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, 41: 1004-1009, 1997.
11. Wallace Jr, R.J. et al. Susceptibility Testing of Slowly Growing Mycobacteria by a microdilution MIC Method with 7H9 Broth. **J. Clin. Microbiol.**, 24: 976-981, 1986.
12. Telles, M.A.S.; Yates, M.D. Single and double drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and mycobacteria other than the tubercle (MOTT) bacilli by a micro-dilution broth medium minimum inhibitory concentration (MIC) method. **Tubercle and Lung Disease.**, 75: 286-290, 1994.
13. Ericson, H.M.; Sheris, J.C. Antibiotic sensitivity testing: report for an international collaborative study. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 217: 3-90, 1971.

Recebido em 08/09/1999; Aprovado em 04/05/2000