

PERFIL DE SENSIBILIDADE AO TRICLOSAN DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES A ISONIAZIDA

DAIANE PORTO GAUTÉRIO^{*}
MARTA OSÓRIO RIBEIRO^{**}
ANDREA VON GROLL^{***}
MÁRCIA SILVA^{****}
DANIELA FERNANDES RAMOS^{*****}
MARIA LUCIA ROSSETTI^{*****}
CARLOS JAMES SCAINI^{*****}
PEDRO EDUARDO ALMEIDA DA SILVA^{*****}

RESUMO

Triclosan é um biocida amplamente utilizado na comunidade e nos hospitais. Um dos alvos do triclosan é uma enoil-redutase que está presente no *Mycobacterium tuberculosis*, sendo também o principal alvo da isoniazida (INH), um importante fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose. O uso de biocidas que compartilham alvos similares com antimicrobianos de uso humano podem gerar resistência cruzada com estes e devem ter o seu uso criteriosamente avaliado. Neste estudo, determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) do triclosan e INH para 46 isolados clínicos de *M. tuberculosis* previamente identificados como resistentes a INH, tendo sido observados altos níveis de resistência para INH e sensibilidade ao triclosan para todas as cepas.

PALAVRAS-CHAVES: resistência aos antimicrobianos, *Mycobacterium tuberculosis*; triclosan, isoniazida.

^{*} Enfermeira

^{**} Farmacêutica-bioquímica; Mestre em Ciências da Saúde

^{***} Médica-veterinária; Mestre em Ciências Veterinárias

^{****} Bióloga; Doutora em Biologia Molecular

^{*****} Bióloga

^{*****} Farmacêutica-bioquímica; Doutora em Biologia Molecular

^{*****} Médico-veterinário; Doutor em Biotecnologia – UFPel

^{*****} Farmacêutico-bioquímico; Doutor em Microbiologia – Univ. Zaragoza; Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FURG. E-mail: pedrefurg@gmail.com

ABSTRACT

Susceptibility profile to triclosan of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistant

Triclosan is widely used in domestic and nosocomial places. One of the targets of triclosan is an enoyl-reductase present in *M. tuberculosis* and also is the main target to isoniazid (INH), which is an important drug for treatment of tuberculosis. The use of biocides that share similar targets with antimicrobials of human use can generate cross-resistance with these ones and it must be carefully evaluated. In this study was determined the minimal inhibitory concentration (MIC) of triclosan and INH to 46 clinical isolates of *M. tuberculosis*, previously identified as INH resistant by the proportion method. High levels of resistance to INH and susceptibility to triclosan were found in all strains.

KEY-WORDS: resistance, *Mycobacterium tuberculosis*; triclosan, isoniazid.

1 – INTRODUÇÃO

A tuberculose permanece como um grave problema mundial. Estima-se que existam cerca de 14 milhões de pessoas com TB em todo o mundo. Essa situação agrava-se ainda mais na medida em que 8 e 6% dos novos casos de TB são, respectivamente, de pacientes co-infectados com HIV ou portadores de cepas multidroga-resistentes (MDR), cujo tratamento é menos eficaz e a evolução da doença tende a ser mais grave⁽¹⁾.

De fato, o aumento de casos de TB causados por cepas resistentes aos fármacos anti-TB é um sério problema, na medida em que, por características inerentes ao *Mycobacterium tuberculosis*, o número de antimicrobianos eficazes para o tratamento da TB é bastante reduzido^(2, 3).

A isoniazida (INH), um dos principais antibacterianos utilizados para o tratamento da TB⁽⁴⁾, é um pró-fármaco ativado dentro da célula bacteriana por uma enzima (KatG) com atividade catalase peroxidase que é codificada pelo *katG* gene⁽⁵⁾. A INH tem uma atividade pleotrópica atuando em diversos alvos dentro da célula bacteriana – em especial a INH interfere com a síntese de ácidos micólicos inibindo uma enoil-redutase codificada pelo gene *inhA*^(4, 6).

Embora a maioria dos isolados resistentes a INH apresentem alterações na sequência de DNA e/ou deleções em *katG*^(7, 8), aproximadamente 15% das cepas resistentes a INH apresentam mutações em *inhA* ou, mais frequentemente, na região promotora desse gene^(5, 9, 10).

O uso de biocidas, de utilização doméstica ou não, contendo antibacterianos aumentou cerca de seis vezes nos últimos dez anos.

Esses produtos têm sido desenvolvidos e utilizados satisfatoriamente para a prevenção de doenças infecciosas, particularmente nos hospitais. Por outro lado, é provável que o uso desses produtos também determine uma pressão que favoreça a seleção de cepas resistentes para o próprio biocida, bem como para antimicrobianos de interesse clínico através de uma resistência cruzada^(11, 12).

Triclosan (Irgasan[®]) é um agente antimicrobiano utilizado como parte da fórmula de sabonete, creme dental, detergente doméstico e hospitalar, plástico etc. Há dez anos foi descrito que este composto interfere na síntese de lipídeos em *Escherichia coli* inibindo uma enoil-redutase (FabI)^(12, 13, 14). Outros estudos demonstraram que o triclosan também inibe uma enoil-redutase presente em *M. smegmatis*⁽¹³⁾ e *M. tuberculosis*^(15, 16).

Essa enzima está envolvida com a síntese de ácidos micólicos que são componentes essenciais para a parede celular das micobactérias e é o principal alvo da INH, um dos mais importantes antimicrobianos utilizados no tratamento da TB.

Com o propósito de verificar uma possível resistência cruzada entre INH e triclosan, determinamos a concentração mínima inibitória (CMI) de ambos os antimicrobianos para isolados clínicos de *M. tuberculosis*, previamente caracterizados como resistentes a INH pelo método das proporções.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e reagentes

As cepas de *M. tuberculosis*, pertencentes ao banco de cepas da FEPPS, foram preservadas em meio de cultivo Ogawa-Kudoh e posteriormente semeadas em meio 7H9 enriquecido com OADC (ácido oléico, albumina, dextose e catalase) por um período de sete dias antes da determinação do concentração mínima inibitória (CMI). A incubação foi realizada em agitador orbital (B. Braun Biotech International Certomach BS1 USA) a 37°C. O mesmo procedimento foi realizado com a cepa controle H37Rv, caracterizada como sensível aos antimicrobianos utilizados no tratamento da tuberculose.

Foram utilizados isoniazida (Sigma[®], lot 91K1467), Triclosan (C12H7Cl3O2 IrgasanDP 300[®], lot 2071TFR1) e Resazurina (Applied Research Institute – USA).

Determinação da concentração mínima inibitória

O método REMA (Resazurin Microtitre Assay) foi utilizado para determinar a CMI, tendo sido realizado como previamente escrita⁽¹⁷⁾. Resumidamente, foram utilizadas microplacas com 96 poços, onde foram colocados meio de cultivo 7H9-OADC (75µl) e os antimicrobianos a serem testados (diluição 1:2). O inóculo foi preparado adicionando-se dez pérolas de vidro de 3mm num tubo contendo cultivo de sete dias, com posterior agitação para promover a desagregação dos grumos de bactérias. A suspensão teve a turbidez ajustada para o tubo número da escala de McFarland e posteriormente diluída 1:25 em 7H9 OADC e distribuída (75µl) em microplacas de 96 poços, as quais foram incubadas a 37°C por cinco dias. Após a incubação foi adicionada (30µl) resazurina em cada poço, sendo a leitura realizada dois dias depois.

Sequenciamento

O sequenciamento do DNA foi realizado em um equipamento Applied Biosystems ABI modelo 373, utilizando os oligonucleotídeos constantes na tabela 1 e Taq DyeDeoxy terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., USA).

TABELA 1 – Lista de oligonucleotídeos utilizados para amplificar os principais *loci* cujas mutações estão envolvidas com resistência a INH.

<i>Locus</i>	<i>Oligonucleotídeos</i>	<i>Tamanho do fragmento de DNA pb</i>
katG1	5'CATGAACGACGTGCAAACAG3'	232
katG2	5'CGAGGAAACTGTTGTCCCAT3'	
ahpC 1	5'GCCTGGGTGTTTC GTCACTGGT3'	359
ahpC 2	5'CGCAACGTCGACTGGCTCATA3'	
inhA1	5'GAACTCGACGTGCAAAAC3'	206
inhA2	5'CATCGAAGCATACGAATA3'	

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da CMI da INH e triclosan mostrou, respectivamente, as concentrações de 0,04µg/ml e 16µg/ml como inibitórias para cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. A CMI da INH para os

46 isolados clínicos de *M. tuberculosis* ficou entre 10 e 78µg/ml, confirmando a prévia caracterização de cepas resistentes, realizada pelo método das proporções (Tabela 2), enquanto a CMI do triclosan ficou entre 2 e 32µg/ml.

TABELA 2 – Concentrações inibitórias da INH relacionada com o número de cepas

Número de cepas	INH CMI (µg/ml)
31	10µg/ml
3	19µg/ml
2	39µg/ml
1	78µg/ml
10	>78µg/ml

Das quatro cepas que tiveram sequenciados os *loci katG, inhA e ahpC*, três apresentam alguma das clássicas mutações já descritas e que estão relacionadas com resistência a INH. A CMI para as quatro cepas foi de 10 e 8-16µg/ml para INH e triclosan respectivamente (Tabela 3). É interessante observar que uma cepa resistente a INH não apresentou nenhuma alteração mais comum em cepas resistentes a esse fármaco. Isso permite inferir que exista alteração em outro local não avaliado neste estudo ou o envolvimento de outros mecanismos de resistência.

As mutações em *katG* configuram-se na principal base molecular da resistência a INH observada em isolados clínicos de *M. tuberculosis* e aparentemente não estão relacionadas a resistência ao triclosan. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que pelo menos 15% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH mostram alguma alteração no locus *inhA*, seja na região promotora ou codificadora do gene^(5, 7, 8).

TABELA 3 – Lista de cepas resistentes a INH com a alteração observada e as respectivas CMI

Cepa	Mutação	CMI (µg/ml)	
SP83239IAL	<i>inhA</i> (região promotora) C(15)T	Isoniazida >10	Triclosan 16
RJ325HF	<i>katGS315T</i>	>10	16
RJ1896HF	<i>inhA</i> (região codificadora) S94A e região promotora C(35)T	>10	16
SP72060IAL	Sem mutação nos <i>loci</i> avaliados	>10	8

Neste estudo, todas as 46 cepas estudadas mostraram-se sensíveis ao triclosan. Embora oito cepas tenham se apresentado ligeiramente mais resistentes do que o a cepa controle, os valores não superaram duas vezes a CMI observada contra a cepa controle, tendo sido consideradas como sensíveis para o triclosan.

Quatro cepas que apresentaram CMI para INH >10µg/ml e que tiveram os *loci katG*, *inhA* e *ahpC* sequenciados mostraram níveis de resistência similares para o triclosan, tendo sido igualmente consideradas sensíveis. Uma cepa apresenta a clássica mutação KatG (S315T), que está presente na maioria dos isolados resistentes a INH. Outras duas cepas apresentam mutações no *locus inhA*, uma com uma única mutação na região promotora C(15)T e outra com mutações tanto na região promotora C(35)T como codificadora S94A. Poder-se-ia esperar que as cepas mutadas em *inhA* apresentassem níveis de resistência ao triclosan superiores às demais. Entretanto isso não foi observado e pode ser explicado pela demonstração de que algumas mutações que conferem resistência a INH não estabelecem resistência cruzada com o triclosan⁽¹⁵⁾.

De maneira geral, os mecanismos pelos quais os microrganismos apresentam resistência ao triclosan incluem mutações, aumento do efluxo e inativação enzimática. Estes são também os mesmos mecanismos envolvidos em resistência aos antimicrobianos, sendo razoável supor que, tendo os alvos iguais, para ambos, antimicrobiano e biocida, exista o risco de que o uso destes possa determinar uma pressão seletiva que resulte em resistência cruzada^(11, 12, 13, 14, 15).

Deve-se reconhecer que o uso de biocidas trouxe uma importante redução na transmissão de agentes infecciosos, entretanto o seu uso aumenta o risco de seleção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos utilizados na terapia das doenças infecciosas. É importante destacar que, além de alterações em alvos específicos, a resistência cruzada entre biocidas e antimicrobianos pode também ocorrer por seleção de microrganismos que apresentem mecanismos mais inespecíficos de resistência, como efluxo e alteração de permeabilidade.

Os resultados deste estudo não permitem estabelecer uma resistência cruzada entre INH e triclosan, embora seja importante considerar que o uso desses produtos deve ser monitorado para avaliar o risco, em particular no que diz respeito a resistência cruzada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu suporte financeiro da UNICEF/UNDP/Worldbank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

REFERÊNCIAS

1. WHO Report. 2008. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing.
2. Duncan, K. 2003. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis* 83:201-7.
3. Honscha G, Von Groll A, Valença M, Ramos DF, Sanchotene K, Scaini CJ, et al. 2008. The laboratory as a tool to qualify tuberculosis diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 12(2): 218-20.
4. Vilchèze C, Jacobs WR Jr. 2007. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol.* 61:35-50.
5. Zhang Y, Telenti A. 2000. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs WR Jr. *Molecular of Mycobacteria*. Washington (DC): ASM Press; 235-54.
6. Takayama K, Schnoes HK, Armstrong EL, Boyle RW. 1975. Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Lipid Res.* 16(4):308-17.
7. Cockerill FR 3rd. 1999. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:199-212.
8. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A et al. 2003. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 41(9):4471-4.
9. Kim SY, Park YJ, Kim WI, Lee SH, Chang CL, Kang SJ et al. 2002. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 47:497-502.
10. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A et al. 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1241-50.
11. Levy SB. 2001. Antibacterial household products: cause for concern. *Emerg Infect Dis.* 7(3 Suppl): 512-5.
12. Aiello AE, Larson E. 2003. Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infect. Dis.* 3:5016.
13. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature.* 394:53132.
14. Schweizer HP. 2001. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett.* 7:202(1):17.
15. Parikh S, Xiao G, Tonge PJ. 2000. Inhibition of InhA, the Enoyl Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry*; 39:764550.
16. Betts JC, McLaren A, Lennon MG, Kelly FM, Lukey PT, Blakemore SJ et al. 2003. Gene expression profiles discriminate between isoniazid, thioamycin and triclosan treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:290313.
17. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:272022

