

Natalia Fernandes Garcia de Carvalho

**Caracterização fenotípica e molecular de cepas de
Mycobacterium abscessus quanto ao perfil de
resistência à Claritromicina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Profa. Dra. Erica Chimara

**SÃO PAULO
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Carvalho, Natalia Fernandes Garcia de

Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Mycobacterium abscessus* quanto ao perfil de resistência à claritromicina / Natalia Fernandes Garcia de Carvalho – São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Erica Chimara

1. Micobactérias não tuberculosas /efeito de drogas
2. Especiação genética
3. Resistência a medicamentos
4. Claritromicina

SES/CCD/CD- 297/14

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais César e Tânia e ao meu avô Antônio (in memoriam),
exemplos de dedicação e determinação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

À Dra. Erica Chimara, pelos valiosos ensinamentos, confiança e por me conceder a oportunidade de conquistar uma etapa tão importante em minha vida.

Ao Centro de Virologia, por disponibilizar equipamentos e o laboratório para a realização deste trabalho.

À Dra. Daisy Nakamura Sato, ao Dr. Fernando Pavan e a toda equipe do Laboratório de Micobacteriologia da UNESP, Campus Araraquara, pela disponibilidade e colaboração para a realização deste trabalho.

À Dra. Lucilaine Ferrazoli, pelo apoio e incentivo à minha carreira profissional.

À toda equipe do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, pelo apoio, pela disponibilidade do laboratório e amizade.

Aos funcionários do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas e do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais pela disponibilidade do uso de alguns equipamentos.

Aos funcionários do Centro de Bacteriologia por todos os ensinamentos e colaborações.

Às amigas Juliana Failde, Juliana Pinhata, Ana Paula Cassiolato, Maria Fernanda Bueno, Gabriela Rodrigues Francisco e Maria Luiza Guerra pelo apoio, amizade e por todos os momentos que passamos juntas.

Aos meus pais, César e Tânia, e ao meu irmão, Marcelo, pelo constante apoio e incentivo para conquistar minha formação profissional, os amo incondicionalmente.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Bacteriologia, Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.

Carvalho, N.F.G. Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Mycobacterium abscessus* quanto ao perfil de resistência à Claritromicina.

Resumo

Mycobacterium abscessus é a espécie entre as micobactérias de crescimento rápido (MCR) mais comum como agente etiológico de doença pulmonar, apresentando elevada resistência aos antibióticos utilizados no tratamento. É uma das espécies mais frequentes isoladas, sendo responsável por 80% das infecções pulmonares causadas por MCR. Alguns estudos relataram resistência adquirida e induzida a claritromicina, um dos principais fármacos utilizados no tratamento. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os isolados do grupo *M. abscessus* quanto ao perfil de resistência a claritromicina de pacientes do Estado de São Paulo, isolados no período de 2010 a 2011, pelo padrão de mutação nos genes *erm(41)* e *rrl*. Foram incluídos no estudo os isolados identificados como *M. abscessus* tipo 1 e tipo 2 pela técnica PRA-*hsp65* na rotina diagnóstica do Instituto Adolfo Lutz. A confirmação da espécie foi realizada pelo sequenciamento do gene *rpoB*. O teste de suscetibilidade a claritromicina foi realizado de acordo com as recomendações do CLSI (2011) e com incubação estendida por 14 dias com leituras nos dias 5, 7 e 10. A pré-incubação dos isolados com 0,01 e 0,1ug/ml de claritromicina foi testada para verificar se uma incubação prévia era capaz de induzir a resistência. O perfil genético dos isolados foi obtido por meio do sequenciamento dos genes *rrl* e *erm(41)*. Foram selecionados 151 isolados, mas somente 135 foram viáveis para análise. Destes, 78 eram *M. abscessus* tipo 1 e 57 tipo 2. Dos isolados *M. abscessus* tipo 1, todos foram identificados como "*M. abscessus*" pelo sequenciamento do gene *rpoB*, e daqueles identificados como tipo 2, dois foram identificados como "*M. abscessus*", 27 "*M. massiliense*", 27 "*M. bolletii*" e um *M. porcinum*, este último, excluído da análise. O CIM foi padronizado para ser lido com o corante vital resazurina, apresentando elevado valor de correlação com a

leitura visual (93,3%). No CIM com leitura em 14 dias, 10 isolados de “*M. abscessus*” foram sensíveis (S), 64 resistentes induzidos (RI) e quatro resistentes (R). Dos isolados de “*M. bolletii*”, 5 foram S, 20 RI e 2 R. Dos isolados de “*M. massiliense*”, 24 foram S e 3 RI. A obtenção de 21,3% de isolados RI no 14º dia de leitura mostrou a importância do período completo na detecção da resistência. O teste de pré-incubação com claritromicina foi capaz de induzir a resistência somente quando os isolados foram pré-incubados na concentração de 0,1µg/ml por 72 horas. Somente cinco isolados S apresentaram o perfil genético esperado, com o polimorfismo C28 no gene *erm(41)* e A2058 no gene *rrl*. Todos os isolados com RI apresentaram perfil esperado, com o polimorfismo T28 no gene *erm(41)*. Dentre os isolados R, somente um apresentou a mutação A2058G no gene *rrl*. A análise das sequências do gene *erm(41)* evidenciou que 97% dos isolados foram agrupados de acordo com a identificação da espécie. Os resultados sugerem a necessidade de uma adequação no teste de suscetibilidade, em razão da elevada porcentagem de isolados RI e a utilidade do gene *erm(41)* como ferramenta de identificação e detecção de resistência a claritromicina.

Palavras-chave: Micobactérias não tuberculosas, especiação genética, resistência a medicamentos, claritromicina.

Carvalho, N.F.G. Phenotypic and Molecular characterization of *Mycobacterium abscessus* isolates by clarithromycin resistance profile.

Abstract

Mycobacterium abscessus is the most common etiological agent of pulmonary disease among the rapidly growing mycobacteria (RGM), exhibiting high resistance to the antibiotics used in the treatment. It is one of the most frequently isolated species, accounting for 80% of lung infections caused by RGM. Some studies reported acquired and induced resistance to clarithromycin, a major drug used in the treatment. The aim of this study was to characterize *M. abscessus* isolates according to the clarithromycin resistance profile from patients of the State of São Paulo, isolated in the period from 2010 to 2011, by mutations patterns in the *erm(41)* and *rrl* genes. Isolates identified as *M. abscessus* type 1 and type 2 by PRA-*hsp65* technique for the routine diagnosis at Institute Adolfo Lutz were included in the study. Species confirmation was performed by *rpoB* gene sequencing. The clarithromycin susceptibility test was performed according to the CLSI recommendations (2011), and with extended incubation for 14 days with readings on days 5, 7, and 10. Pre-incubation of the isolates with 0.01 and 0.1µg/ml of clarithromycin was tested to verify if the pre-incubation could induce resistance. The genetic profile of the isolates was obtained by sequencing *rrl* and *erm(41)* genes. We selected 151 isolates, but only 135 were viable for analysis. Of these, 78 were *M. abscessus* type 1 and 57 type 2. The isolates *M. abscessus* type 1, all were identified as "*M. abscessus*" by sequencing the *rpoB* gene, and among those identified as type 2, two were identified as "*M. abscessus*", 27 "*M. massiliense*", 27 "*M. bolletii*" and one *M. porcinum*, the last being excluded from the analysis. The MIC was standardized to be read with the vital dye resazurin, showing high correlation value with visual readings (93.3%). In MIC with readings after 14 days, 10 isolates of "*M. abscessus*" were susceptible (S), 64 with inducible resistance (IR) and four

resistant (R). Among "*M. bolletii*" isolates, five were S, 20 IR and two R. Of "*M. massiliense*" isolates, 24 were S and three IR. Obtaining 21.3% of IR isolates on day 14 showed the importance of reading up to the end of the period for detecting resistance. The pre-incubation test with clarithromycin induced resistance only when the strains were pre-incubated with the concentration of 0.1 µg/ml for 72 hours. Only five S isolates had the expected genetic profile with the C28 polymorphism in the *erm(41)* gene and A2058 of the *rrl* gene. All isolates with IR presented the expected profile with the T28 polymorphism in the *erm(41)* gene. Among the R isolates, only one had the A2058G mutation in *rrl* gene. Sequence analysis of the *erm(41)* gene showed that 97% of isolates were grouped according to species identification. The results suggest the need for an adjustment in susceptibility testing, due to the high percentage of IR isolates and the usefulness of the gene *erm(41)* as a tool for identification and detection of resistance to clarithromycin.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, genetic speciation, drug resistance, clarithromycin.

Lista de abreviaturas e siglas

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BHI	Brain Heart Infusion
CC	Controle do crescimento
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CM	Controle do meio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IAL	Instituto Adolfo Lutz
LJ	Lowenstein Jensen
MCL	Micobactéria de crescimento lento
MCR	Micobactéria de crescimento rápido
MHC	Mueller Hinton Cation Ajustado
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRA	PCR e análise de restrição
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SIGH	Sistema Integrado de Gestão Hospitalar
UFC	Unidade formadora de colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista
URL	Unidade Relativa de Luz

Lista de Figuras e Quadros

- Figura 1.** Mecanismo de ação dos macrolídeos e resistência induzida. 28
O macrolídeo se liga ao 23S rRNA, impedindo a síntese protéica. A expressão das proteínas *erm* (M) em resposta ao macrolídeo leva a uma modificação do sítio de ligação ribossomal e induz a resistência ao macrolídeo.
- Figura 2.** Ilustração sobre a produção de metil transferases induzida 30
em presença de claritromicina. A resistência aos macrolídeos é maior após exposição à claritromicina do que à azitromicina em *M. abscessus*. Entretanto, nenhum macrolídeo pode promover resistência induzida em *M. massiliense*, pois este possui o gene *erm(41)* defeituoso.
- Figura 3.** Produtos de amplificação da PCR do gene *erm(41)* das 31
espécies *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. bolletii*. Amplificados de DNA do gene *erm(41)* de isolados de *M. massiliense* (133, 134 e 140) são menores (397pb) do que aqueles de isolados de *M. abscessus* (135,138 e 141) e *M. bolletii* (194) (673pb). Como resultado, *M. massiliense* pode ser facilmente diferenciado de *M. abscessus* e *M. bolletii* baseado na análise de PCR do gene *erm(41)*.
- Figura 4.** Esquema representativo da organização das placas de MIC e 41
as concentrações finais de claritromicina em cada orifício em µg/ml.
- Figura 5.** Alinhamento dos primers utilizados para amplificação do gene 45
erm(41) baseado na descrição de Maurer e col. (2012), com a sequência de *M. abscessus* (GenBank EU590129) e localização do fragmento que contém a posição 28 (em vermelho).
- Figura 6.** Dendrograma de isolados de *M. abscessus sensu lato* 61
baseado nos resultados de sequenciamento do gene *erm(41)*, criado com auxílio do programa Bionumerics versão 7.1, pelo método neighbor-joining.
- Quadro 1.** Correlação entre os perfis genéticos conhecidos atualmente 34
dos genes *rrl* e *erm(41)* do grupo *M. abscessus* e o perfil de suscetibilidade *in vitro* à claritromicina.
- Quadro 2.** Fórmula aplicada no cálculo da porcentagem de inibição 40
bacteriana, utilizando os valores de unidades relativas de luz.

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Identificação por sequenciamento do gene *rpoB* dos 134 isolados incluídos no estudo. 48
- Tabela 2.** Características demográficas dos 105 pacientes com isolados identificados como *M. abscessus* pelo método PRA-hsp65 no Instituto Adolfo Lutz, 2010-2011. 49
- Tabela 3.** Avaliação do teste de suscetibilidade à claritromicina com o uso de resazurina, comparando os valores de CIM lidos visualmente com os valores de CIM obtidos após utilização do corante resazurina. 51
- Tabela 4.** Perfil de suscetibilidade a claritromicina após três dias de incubação, conforme espécie identificada pelo sequenciamento do gene *rpoB*. 53
- Tabela 5.** Perfil de suscetibilidade a claritromicina após 14 dias de incubação, conforme espécie identificada pelo sequenciamento do gene *rpoB*. 54
- Tabela 6.** Perfil de suscetibilidade a claritromicina após três dias de incubação de acordo com a classificação do CLSI e conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*. 54
- Tabela 7.** Resultado de CIM de isolados pré-incubados com claritromicina nas concentrações de 0,01µg/ml e 0,1µg/ml por um período de 24 horas. 55
- Tabela 8.** Resultado de CIM de isolados pré-incubados com claritromicina na concentração de 0,1 µg/ml por 24, 72 e 120 horas. 56
- Tabela 9.** Perfil genético dos genes *rrl* e *erm(41)* e resultados de CIM após três dias de incubação conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*. 57
- Tabela 10.** Perfil genético dos genes *rrl* e *erm(41)* e resultados de CIM após 14 dias de incubação conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*. 57

Lista de Anexos

Anexo 1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEPIAL)	83
Anexo 2. Cronograma de preparação e realização de teste de suscetibilidade à claritromicina na UNESP Campus Araraquara	84
Anexo 3. Resultados obtidos para os 134 isolados estudados.	85

Índice

1. Introdução	17
1.1 Características do gênero <i>Mycobacterium</i>	17
1.2 Identificação	18
1.3 Micobactérias não tuberculosas (MNT)	19
1.4 <i>Mycobacterium abscessus sensu lato</i>	21
1.4.1 Clínica	23
1.4.2 Epidemiologia	23
1.4.3 Terapêutica	24
1.5 Mecanismos de resistência aos macrolídeos	26
2. Objetivo	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3. Material e Métodos	36
3.1 Isolados	36
3.2 Manutenção dos isolados	36
3.3 Extração de DNA	36
3.4 Teste de suscetibilidade a claritromicina	37
3.4.1 Avaliação de armazenamento de inóculo e utilização da resazurina	37
3.4.2 Obtenção da CIM dos isolados do estudo	38
3.4.3 Teste de pré-incubação com claritromicina	41
3.5 Sequenciamento do gene <i>rpoB</i>	42
3.6 Sequenciamento do gene <i>rrl</i>	43
3.7 Sequenciamento do gene <i>erm(41)</i>	44
3.8 Análise das sequências do gene <i>erm(41)</i>	46
3.9 Análise demográfica	47
4. Resultados	48
4.1 Isolados	48
4.2 Identificação da espécie e características demográficas	48

4.3 Teste de suscetibilidade	50
4.3.1 Avaliação de armazenamento de inóculo e utilização da resazurina	50
4.3.2 Obtenção da CIM dos isolados do estudo	52
4.3.3 Teste de pré-incubação com claritromicina	55
4.4 Sequenciamento dos genes <i>erm</i> (41) e <i>rrl</i>	56
4.5 Análise das sequências do gene <i>erm</i> (41)	58
5. Discussão	62
6. Conclusão	71
7. Referências Bibliográficas	74
Anexo 1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEPIAL)	83
Anexo 2. Cronograma de preparação e realização de teste de suscetibilidade à claritromicina na UNESP Campus Araraquara.	84
Anexo 3. Resultados obtidos para os 134 isolados estudados.	85

1. Introdução

1.1 Características do gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* contempla as espécies do complexo *M. tuberculosis* e as denominadas Micobactérias Não Tuberculosas (MNT). As espécies desse gênero são aeróbicas, não formam esporos, são imóveis e apresentam morfologia pleomórfica, com bacilos ligeiramente curvos, os quais podem produzir filamentos (Pfyffer, 2006).

As espécies desse gênero possuem tempo de geração que pode variar entre 2 e 20 horas. O lento tempo de crescimento está relacionado à espessura da parede celular, que é conferida por complexos lipídicos associados a ácidos micólicos, lipoarabinomanano e manosídeos fosfatidilinositol (Medjahed et al., 2010). A parede celular também contribui para a fisiologia e virulência desses organismos, pela hidrofobicidade e impermeabilidade a diversas substâncias, incluindo antibióticos e desinfetantes (Falkinham, 2003). O alto conteúdo lipídico da parede celular é responsável pela característica de álcool-ácido resistência, como na coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, na qual a micobactéria não se decora facilmente em presença de uma solução de álcool-ácido. As micobactérias são consideradas Gram positivas, apesar de não se corarem facilmente pela técnica de Gram, uma vez que os complexos lipídicos impedem a penetração de corantes comuns.

As MNT podem ser classificadas de acordo com o tempo de crescimento, sendo micobactérias de crescimento rápido (MCR) as que apresentam colônias visíveis até sete dias de crescimento em meio de cultura sólido a partir de um inóculo padronizado, e micobactérias de crescimento lento (MCL), que apresentam colônias visíveis após sete dias. Além disso, podem ser classificadas de acordo com a produção de pigmento, micobactérias fotocromógenas as que apresentam pigmentação somente em presença de luz, acromógenas as que não pigmentam e as escotocromógenas que apresentam

pigmentação tanto em presença quanto em ausência de luz (Runyon et al., 1959).

1.2 Identificação

Atualmente, estão descritas 169 espécies e 13 subespécies de micobactérias (Euzéby, 2014). Para a diferenciação dessas espécies existem várias técnicas de identificação, tanto fenotípicas como genotípicas. Os testes fenotípicos são baseados no crescimento *in vitro* em presença de diversas substâncias, na morfologia da colônia, na produção de pigmentos e em atividades metabólicas (Chimara et al., 2008; Nash et al., 2009). Entretanto, demandam tempo e um trabalho intensivo, levando algumas semanas para serem finalizados (Pourahmad et al., 2009).

Os métodos baseados em análise de DNA permitem uma identificação mais rápida e precisa que a baseada em métodos fenotípicos. Há vários métodos moleculares disponíveis, comerciais ou não. Um dos primeiros métodos comerciais amplamente utilizados foi o Accu-Probe (Gen-Probe Incorporated, San Diego, USA). A grande limitação desta metodologia encontra-se no número reduzido de sondas de DNA disponíveis, limitando a identificação a três espécies de micobactérias não tuberculosas (*M. kansasii*, *M. goodii*, *M. avium*) e as espécies dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*. Posteriormente, outras metodologias baseadas em sondas foram desenvolvidas e comercializadas, a exemplo da Geno-Type Mycobacteria CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha) e Speed Oligo Mycobacteria (Vircell, Granada, Espanha). No entanto, estes testes identificam apenas as espécies mais frequentemente isoladas em laboratórios clínicos (Telenti et al., 1993; Chimara et al., 2008; Pourahmad et al., 2009; Costa et al., 2010). Um teste muito usado por laboratórios de referência e pesquisa é baseado em PCR associado à análise de restrição enzimática (PRA) de um fragmento de 441 bp do gene *hsp65*, que codifica uma proteína que é sintetizada em situações de

stress térmico (do inglês *heat shock protein*) (Telenti et al., 1993; Costa et al., 2009). As diferentes espécies de micobactérias apresentam padrões de fragmentos de restrições distintos, permitindo que a identificação da espécie de um isolado desconhecido seja determinada pela comparação com algoritmos publicados (Chimara et al., 2008). No entanto, esse método possui como limitação a presença de perfis idênticos para diferentes espécies, impossibilitando a identificação de algumas espécies (Chimara et al., 2008).

O sequenciamento de fragmentos de genes tem sido considerado padrão ouro na identificação dessas espécies, e os genes mais utilizados são o gene da subunidade ribossomal 16S rRNA (Groote & Huitt, 2006), o gene *hsp65* (Telenti et al., 1993) e o gene *rpoB* (Costa et al., 2009).

Em razão das limitações de ambas as metodologias, fenotípicas e moleculares, os laboratórios, de modo geral, têm utilizado a combinação de ambas, uma vez que o número de espécies descritas tem aumentado de forma exponencial (Chimara et al., 2008; Dai et al., 2011). Nos últimos cinco anos foram descritas 35 novas espécies, 21,2% do total de espécies aceitas (Euzéby, 2014).

1.3 Micobactérias não tuberculosas (MNT)

As MNT constituem um grupo de bactérias encontradas em uma grande variedade de ambientes, como reservatórios de águas naturais, solo, poeira, rochas e animais. São organismos que podem causar diferentes tipos de doenças em humanos, e o espectro de suas infecções pode variar do menor grau, de doença cutânea auto-limitada, à infecção generalizada com risco de vida, que pode não ter um tratamento eficaz. Historicamente, as MNT eram consideradas capazes de causar doença somente em indivíduos imunocomprometidos, mas atualmente são reconhecidas como importantes patógenos em indivíduos imunocompetentes (Jarzembowski et al., 2008). Esses organismos normalmente causam doença de pele, linfadenite, doença pulmonar

e doença disseminada principalmente em indivíduos gravemente imunocomprometidos (Medjahed et al., 2010; Gayathri et al., 2010; Wongkitisophon et al., 2011). Entretanto, somente no ano de 1950 reconheceu-se a importância das MNT na patologia humana como agentes etiológicos de inúmeros quadros nosológicos (Pitombo et al., 2009).

Por serem encontradas em condições diversas no meio ambiente e por serem resistentes a diversas substâncias, como desinfetantes e antibióticos, indivíduos suscetíveis em contato com estes ambientes podem adquirir infecções, principalmente aquelas relacionadas com procedimentos médicos invasivos (Brown-Elliot & Wallace Jr., 2002; Adekambi et al., 2006; Groote & Huitt, 2006). Essas infecções ocorrem devido à associação da fisiologia do microrganismo com práticas inadequadas de limpeza, procedimentos e desinfecção (Carvalho et al., 2012).

Além disso, a formação de biofilmes tem sido uma estratégia exitosa para várias espécies, sendo uma característica que contribui para a transmissão das MNT, conferindo proteção contra diversas substâncias (Hall-Stoodley et al., 2005).

A verdadeira prevalência das MNT ainda é desconhecida. Historicamente esse grupo foi ofuscado pela tuberculose, sendo descartado como contaminante (Jarzembowski & Young, 2008). Estudos recentes mostram o aumento na incidência de infecções causadas por esses microrganismos, atribuído ao reconhecimento das doenças causadas por MNT e pela emergência de pacientes imunocomprometidos, particularmente pacientes com HIV e aqueles submetidos a transplantes (Braun et al., 2013; Kendall & Winthrop, 2013). Outro importante fator para esse aumento é o avanço nas metodologias nos laboratórios de Micobacteriologia, melhorando a detecção e identificação das MNT a partir de espécimes clínicos (Griffith et al., 2007; Jarzembowski & Young, 2008; Braun et al., 2013; Kendall & Winthrop, 2013).

Dentre as espécies de MCR, as que mais comumente causam doença são *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e *M. abscessus*. Por

sua natureza ambiental e muitas vezes oportunista, essas espécies estão relacionadas com infecções nosocomiais, em pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos, como laparoscopia, implante mamário de silicone e mesoterapia (Adekambi et al., 2006; Castro et al., 2007; Padoveze et al., 2007; Esteban et al., 2008; Duarte et al., 2009). Isto ocorre devido à negligência nos processos de limpeza, desinfecção, esterilização e acondicionamento de instrumentos cirúrgicos somados à alta resistência dessas bactérias a antibióticos e agentes desinfetantes, como cloro, glutaraldeído alcalino e organomercúricos (Falkinham, 2003; Groote & Huitt, 2006; van Ingen et al., 2009; Carvalho et al., 2012).

Esses organismos são naturalmente resistentes aos fármacos convencionais utilizados para o tratamento da tuberculose (isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida), incluindo tetraciclinas, fluoroquinolonas e sulfonamidas (Groote & Huitt, 2006; Petrini, 2006). O tratamento das infecções causadas pelas MCR depende da identificação da espécie, já que cada espécie exibe um padrão diferente de suscetibilidade aos antimicrobianos. *M. abscessus* é a mais notável e mais intrigante, já que é considerada a espécie mais resistente aos antibióticos utilizados entre todas as MCR potencialmente patogênicas (Gayathri et al., 2010; Medjahed, 2010; Maurer et al., 2012).

1.4 Grupo *Mycobacterium abscessus sensu lato*

M. abscessus é uma MCR acromógena, cresce em temperatura de 28 a 37°C, apresenta morfologia de colônia heterogênea, variando de rugosa a lisa (Kusunoki & Ezaki, 1992; Petrini, 2006; Catherinot et al., 2007).

Desde sua primeira descrição, por Moore e Frerichs em 1953, esta espécie já passou por diferentes classificações. Inicialmente, foi considerada como subespécie de *M. chelonae* ou ainda considerada parte do complexo *M. fortuitum* (van Ingen et al., 2009). Somente após 1992 foi considerada como

espécie, resultado de estudos genômicos por meio de hibridação DNA-DNA e pelo reconhecimento de sua patogenicidade em humanos (Griffith *et al.*, 1993; Nessar *et al.*, 2012). Em 2004, Adekâmbi e col. descreveram uma nova espécie, *M. massiliense*, como causa de pneumonia hemoptóica. Posteriormente, em 2006, em estudo sobre MCR, Adekâmbi e col. descreveram a espécie *M. bolletii*. As três espécies, *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* e *M. bolletii* foram propostas com base nas diferenças na sequência do gene *rpoB* e nos perfis obtidos nas provas fenotípicas (Adekambi *et al.*, 2006; Petrini, 2006; Medjahed, 2010).

Leão e col. (2009 e 2010) compararam as espécies *M. massiliense*, *M. bolletii* e as espécies pertencentes ao grupo *M. chelonae* - *M. abscessus*, a partir de isolados clínicos relacionados com o surto ocorrido no Brasil no período de 2004 a 2008. Os resultados de diferentes análises fenotípicas e genéticas, incluindo a hibridação DNA-DNA, revelaram elevada similaridade entre estas espécies, dados que serviram de base para a proposta de uma nova classificação em duas subespécies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, para as cepas *M. abscessus sensu stricto*, e *M. abscessus* subsp. *bolletii*, para as cepas anteriormente classificadas como *M. massiliense* e *M. bolletii*. Essa nova classificação pode ser evidenciada pela técnica de identificação molecular PRA-*hsp65* (Leão *et al.*, 2009; Leão *et al.*, 2011).

No entanto, apesar de *M. massiliense* e *M. bolletii* terem sido classificadas em uma mesma subespécie (*M. abscessus* subsp. *bolletii*), possuem diferenças quanto ao padrão de suscetibilidade a fármacos e ao tratamento (Koh *et al.*, 2011; Bryant *et al.*, 2013). Estudos recentes com análises de genomas completos mostraram evidências que suportam a separação de *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* e *M. bolletii* (Cho *et al.*, 2013).

Muito é discutido sobre a identificação destas espécies já que não existe uma técnica capaz de separar com precisão as espécies *M. massiliense* e *M. bolletii*, acarretando em questionamentos sobre os resultados obtidos por

muitos autores. E em decorrência destas divergências taxonômicas e para atingir os objetivos propostos no presente trabalho, utilizaremos esta última classificação, mantendo separadas “*M. abscessus*”, “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*”.

1.4.1 Clínica

As espécies do grupo *M. abscessus sensu lato* podem causar infecções em diferentes órgãos e tecidos, sendo responsáveis por 80% das doenças pulmonares causadas por MCR, principalmente em pacientes com fibrose cística e com doenças pulmonares crônicas (bronquiectasias, nódulos e cavitações) (Medjahed et al., 2010; Maurer et al., 2012; Shallom et al., 2013). As infecções pulmonares podem ficar dormentes por anos no hospedeiro, podendo induzir a formação de lesões granulomatosas (Medjahed et al., 2010).

As infecções cutâneas ocorrem pela quebra da barreira histológica do hospedeiro concomitantemente com a inoculação da bactéria no tecido. Isto pode ocorrer em procedimentos médicos invasivos, como também em mesoterapia, sugerindo a contaminação de instrumentos médicos, soluções, entre outros, utilizados durante os procedimentos (Adekambi et al., 2006; Petrini, 2006; Padoveze et al., 2007; Ordway et al., 2008; Duarte et al., 2009; Medjahed et al., 2010; Huang et al., 2010; Wongkitisophon et al., 2011).

M. abscessus também é responsável por infecções disseminadas após transplantes e tem a capacidade de atravessar barreiras cerebrais, podendo causar meningites e meningoencefalites (Medjahed et al., 2010).

1.4.2 Epidemiologia

A prevalência das infecções causadas pelas MCR, em especial *M. abscessus*, está aumentando em todo o mundo (Petrini et al., 2006; Cassidy et al., 2009). Em um estudo realizado em Ontario, Canadá, no período de 1997 a

2003, os autores mostraram um aumento de 9,6% na prevalência de MCR pulmonar (Marras et al., 2007). No Estado de São Paulo, a frequência de isolamento de *M. abscessus* aumentou 4,8% comparando-se o período de 1991 a 1997 com 2003 a 2007 (comunicação pessoal). Este aumento deve-se não somente ao avanço nos métodos de diagnóstico, mas também ao aumento de indivíduos com fatores de risco, como câncer, transplante renal, bronquiectasia, fibrose cística, ao crescimento da população na terceira idade e ao compartilhamento de ambientes entre o homem e este microrganismo (Marras et al., 2007; Jang et al., 2014; Mirsaeidi et al., 2014).

1.4.3 Terapêutica

A alta resistência *in vitro* desses microrganismos à maioria dos agentes quimioterápicos é de grande preocupação para a saúde pública (Nessar et al., 2012). Os isolados de infecções causadas por este patógeno geralmente são suscetíveis *in vitro* aos agentes parenterais amicacina, cefoxitina e imipenem, e aos macrolídeos orais azitromicina e claritromicina. Esta última é considerada fundamental no tratamento de infecções pulmonares causadas por *M. abscessus* (Jeon et al., 2009; Bastian et al., 2011; Maurer et al., 2012; Shallom et al., 2013).

O período de tratamento varia de 6 a 12 meses, e muitas vezes é necessária a remoção do tecido lesionado e/ou de corpos estranhos como próteses de silicone e outros materiais (Greendyke & Byrd, 2008; Jeon et al., 2009; Jarand et al., 2011). Entretanto, nos casos de infecções pulmonares, apesar da ressecção cirúrgica auxiliar na resposta ao tratamento com antibióticos, alguns estudos relatam que a cura só foi alcançada em uma minoria dos casos (Petrini, 2006; van Ingen, 2011; Maurer et al., 2012).

Os esquemas terapêuticos são variados e baseiam-se na experiência clínica. A Divisão de Tuberculose do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo dispõe, em sua página

eletrônica, recomendações para tratamentos de infecções pulmonares. Para infecções por *M. abscessus*, recomenda-se o uso de claritromicina e amicacina por 6 a 12 meses mais imipenem ou cefoxitina por 2 a 3 meses (Bombarda et al., 2011). Para infecções por MCR, a Anvisa publicou, em 2009, nota técnica conjunta, com as recomendações de tratamento de acordo com a localização e extensão da lesão.

Outros estudos mostram a variabilidade de esquemas terapêuticos e a dificuldade de obtenção da cura. Em um estudo envolvendo 107 pacientes com doença pulmonar por *M. abscessus*, Jarand e col. (2011) mostraram a variabilidade de tratamentos empregados. Foram utilizados 16 fármacos em 42 combinações e em 23 pacientes foram realizadas cirurgias para retirada de partes mais comprometidas. Para 29% dos pacientes a cultura permaneceu positiva, 23% tiveram recidiva após negativação da cultura e 48% permaneceram com cultura negativa. A permanência de culturas de escarro positivas e os casos de recidiva foram associados à resistência a claritromicina. Os autores enumeraram como fatores responsáveis pela baixa resposta terapêutica, entre outros, a presença de biofilmes, a perda do efeito bactericida dos fármacos e a presença do gene *erm* (41).

Jeon e col. (2009) estudaram 65 pacientes com doença pulmonar por *M. abscessus*, os quais foram tratados com claritromicina, ciprofloxacina e doxiciclina, com um regime inicial de quatro semanas usando amicacina e cefoxitina. A conversão e a permanência do escarro negativo por mais de 12 meses foram obtidas em 58% dos pacientes. No entanto, essa taxa foi bem menor em pacientes com resistência a claritromicina (17%) comparados àqueles sensíveis ou intermediários (64%). Estes pesquisadores também verificaram que as taxas de conversão do escarro e de recidiva estavam associadas à resistência a claritromicina (Jeon et al., 2009).

Devido à suscetibilidade variável de *M. abscessus*, é necessário realizar o teste de suscetibilidade aos fármacos (Petrini, 2006; Huang et al., 2010). O teste recomendando pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) é o

de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que se baseia na menor diluição do fármaco que inibe o crescimento do microrganismo. Esta diluição pode indicar ao médico a concentração do antibiótico necessária para inibir o microrganismo no sítio de infecção (CLSI, 2011). Recomenda-se que sejam testados os seguintes antimicrobianos: amicacina, ciprofloxacina, cefoxitina, claritromicina, doxiciclina (ou minociclina), imipenem, linezolida, moxifloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol e tobramicina. Este teste é recomendado para todas MCR que são consideradas clinicamente significantes, como aquelas isoladas de sangue, tecido, pele, lesões de tecido mole e múltiplos isolamentos do mesmo sítio (Griffith et al., 2007; CLSI, 2011). No entanto, estes resultados podem não refletir completamente a eficácia dos fármacos durante o tratamento, devido a fatores como farmacocinética e aqueles relacionados ao paciente como o local da infecção e o estado imunológico do mesmo (Heginbothom, 2001; Brown-Elliot et al., 2012).

1.5 Mecanismos de resistência aos macrolídeos

Os agentes antimicrobianos do grupo dos macrolídeos são produtos naturais do metabolismo secundário de várias espécies de actinomicetos e atuam ao se ligar à subunidade ribossomal 23S, próxima ao sítio catalítico da região peptidiltransferase. Acredita-se que esta ligação está no canal de saída a partir do centro da peptidiltransferase até a cadeia crescente de peptídeos, sugerindo que os macrolídeos não atuam diretamente como inibidores catalíticos, mas como bloqueadores físicos da saída da cadeia peptídica, prejudicando os estágios iniciais da síntese protéica (Vester & Douthwaite, 2001; Nash et al., 2005; Kim et al., 2010).

A partir de 1990, a claritromicina tornou-se o fármaco de escolha para o tratamento das infecções causadas por *M. abscessus* com relatos de sucesso terapêutico (Maurer et al., 2012). Entretanto, casos de resistência ao tratamento

foram relatados, principalmente em casos de monoterapia (Wallace et al., 1996; Petrini, 2006).

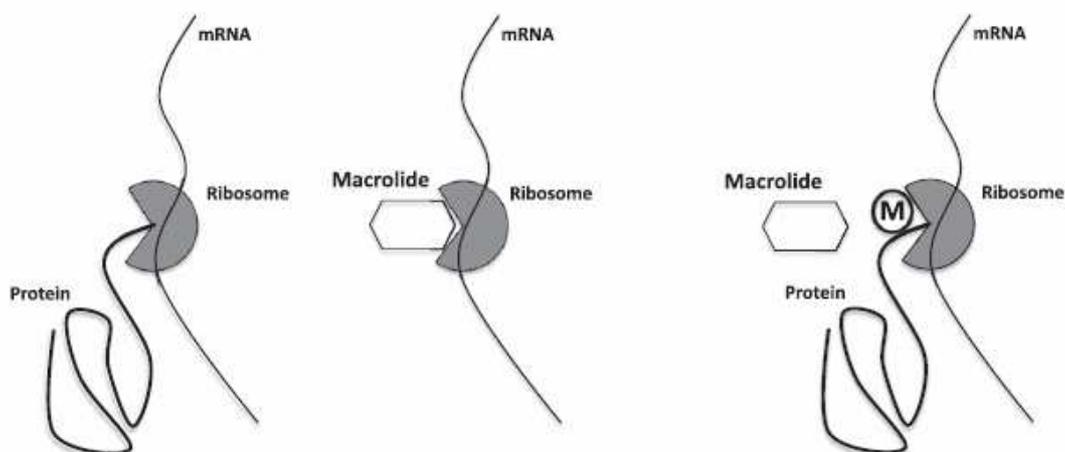
Os mecanismos de resistência a este fármaco podem envolver modificações que alteram a forma e a composição química do sítio de ligação, reduzindo a habilidade dos mesmos em interagir com as unidades ribossomais e inibir a síntese proteica. Estas modificações ocorrem nos genes *rrl* e *erm(41)* (Nash et al., 2009; Bastian et al., 2011; Maurer et al., 2012; Stout & Floto, 2012; Shallom et al., 2013). No entanto, existem evidências de que outros mecanismos de resistência possam estar envolvidos, como bombas de efluxo e inativação do fármaco (Vester & Douthwaite, 2001).

Um dos mecanismos de resistência das espécies do grupo *M. abscessus sensu lato* está associado à mutação no gene *rrl*, o qual é responsável pela codificação do domínio da peptidiltransferase do 23S rRNA. Esta mutação é pontual e ocorre na adenina da posição 2058 (A2058 em *Escherichia coli*) ou 2059 (A2059), conferindo altos níveis de resistência (Wallace et al., 1996; Vester & Douthwaite, 2001; Brown-Elliot et al., 2012).

Wallace e col. (1996) analisaram geneticamente a resistência à claritromicina em isolados de *M. abscessus* e *M. chelonae*, no período de 1990 a 1995, provenientes de pacientes com doença pulmonar crônica ou doença disseminada, tratados apenas com claritromicina. Dos 800 isolados analisados, 18 (2,25%) foram resistentes à claritromicina, e estes foram submetidos ao sequenciamento do gene *rrl*, demonstrando a presença de mutação na adenina da posição 2058 em 38% ou da posição 2059 em 62%. Os autores concluíram que a resistência dessas micobactérias à claritromicina está relacionada com esta mutação no gene *rrl*, mesmo que ocorra em raras situações.

Outro mecanismo de resistência está relacionado à resistência induzida. Em presença de um macrolídeo (Figura 1), detectado direta ou indiretamente pela estagnação do ribossomo, a bactéria induz a expressão do gene *erm(41)*, que codifica uma metil transferase, a metilase resistente a eritromicina, *erm* do inglês *erythromycin resistance methylase* (Petrini, 2006; Griffith, 2010;

Medjahed, 2010; Bastian et al., 2011; Shallom et al., 2013). Essas enzimas metiltransferases, transferem um ou dois grupos metil para uma única adenina na região peptidiltransferase do RNA ribossômico 23S, impedindo a ligação e ação do fármaco (Nash et al., 2003; Nash et al., 2005; Bailey et al., 2008; Stout & Floto, 2012).



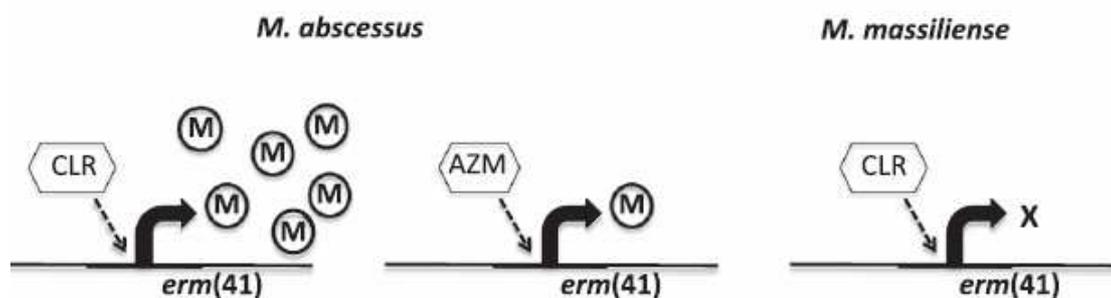
Stout JE, Floto RA. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186(9):822-3.

Figura 1. Mecanismo de ação dos macrolídeos e resistência induzida. O macrolídeo se liga ao 23S rRNA, impedindo a síntese protéica. A expressão das proteínas erm (M) em resposta ao macrolídeo leva a uma modificação do sítio de ligação ribossomal e induz a resistência ao macrolídeo.

Essa modificação parece ser favorável à célula somente em situações de stress, como no caso em que o microrganismo está em presença do fármaco (Bailey et al., 2008, Nash et al., 2009). Entretanto, representa um dos mais eficientes mecanismos de resistência, conferindo não só resistência ao grupo de macrolídeos, mas também induz resistência a lincosamida, estreptogramina B e ao grupo de tetraciclina (Benachi & Costa, 2007). Estes genes estão presentes em outras micobactérias, como *M. tuberculosis* (*erm* (37)), *M. smegmatis* (*erm* (38)), *M. fortuitum* (*erm* (39)), *M. mageritense* (*erm* (40)) e

recentemente foi identificado em *M. abscessus* (*erm* (41)) (Nash et al., 2006; Nash et al., 2009).

Um estudo desenvolvido por Choi e col. (2012) verificou a relação entre o gene *erm*(41) e a resistência aos macrolídeos e os diferentes efeitos da claritromicina e azitromicina na resistência induzida mediada por este gene. Primeiramente, a resistência aos macrolídeos foi determinada, utilizando a microdiluição em caldo, a termo e com incubação estendida por 14 dias para isolados clínicos de "*M. abscessus*" e "*M. massiliense*". A resistência induzida foi observada em todos os isolados de "*M. abscessus*" e foi significativamente maior após a exposição à claritromicina do que à azitromicina. Em contraste, nenhum isolado de "*M. massiliense*" demonstrou a presença de resistência induzida. Em seguida, analisaram a indução do gene *erm*(41) pelos níveis de mRNA expressos, e observaram que a claritromicina induzia níveis muito maiores em "*M. abscessus*" quando comparada com a azitromicina (Figura 2). Para comprovar a ação direta do gene *erm*(41), foram testados um mutante *M. abscessus* knock-out e um transformante "*M. massiliense*" com o gene *erm*(41) funcional. Foi observado que o primeiro não apresentou resistência induzida, enquanto o segundo conferiu este mecanismo. Por último, os autores testaram azitromicina e claritromicina em macrófagos derivados de medula e em modelos de infecção pulmonar, e observaram que ambos os macrolídeos reduziram as infecções, mas que a azitromicina apresentou-se mais eficaz em *M. abscessus*, enquanto para as infecções de "*M. massiliense*" ambos os macrolídeos foram igualmente efetivos.



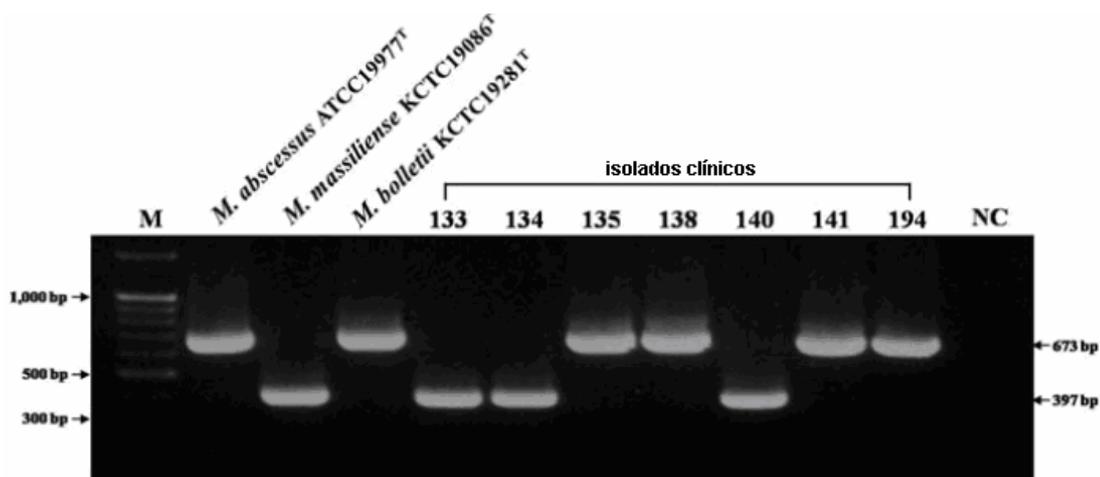
Stout JE, Floto RA. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186(9):822-3.

Figura 2. Ilustração sobre a produção de metil transferases induzida em presença de claritromicina. A resistência aos macrolídeos é maior após exposição à claritromicina (CLR) do que à azitromicina (AZM) em “*M. abscessus*”. Entretanto, nenhum macrolídeo pode promover resistência induzida em *M. massiliense*, pois este possui o gene *erm(41)* defeituoso.

Nash e col. (2009) observaram que a claritromicina pode aumentar os níveis de expressão do mRNA de 23 a 250 vezes em um período de 24 horas. Além disso, os autores concluíram que “*M. abscessus*” pode apresentar-se sensível em um CIM com leitura de três dias, mas, devido à indução da síntese de metiltransferase, a cepa pode ser resistente se a leitura for estendida para 14 dias ou se a cepa for pré-incubada com claritromicina (Nash et al, 2003; Nash et al., 2005; Nash et al., 2009).

Kim e col. (2010) analisaram as sequências do gene *erm(41)* em isolados de “*M. abscessus*”, “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*” fazendo uma correlação com o valor de CIM para claritromicina. Por meio do sequenciamento, os autores observaram que todos os isolados de “*M. massiliense*” sensíveis apresentaram duas deleções, uma menor de dois pares de bases (pb) e uma maior de 274 pb no gene *erm(41)*, enquanto os isolados resistentes apresentaram uma mutação pontual na adenina (posições 2058 ou 2059) no gene *rrl*. Os isolados de “*M. abscessus*” e “*M. bolletii*” não apresentaram esta mutação e as sequências do

gene *erm(41)* apresentaram diferentes perfis de mutação, sem um padrão específico. Os autores concluíram que a utilização de um simples PCR é eficiente para diferenciar “*M. massiliense*” das espécies “*M. abscessus*” e “*M. bolletii*”, por meio da visualização da deleção de 274 pb (Figura 3).



Kim et al. Microbiol Immunol. 2010;54(6):347-53.

Figura 3. Produtos de amplificação da PCR do gene *erm(41)* das espécies “*M. abscessus*”, “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*”. Amplificados de DNA do gene *erm(41)* de isolados de “*M. massiliense*” (133, 134 e 140) são menores (397pb) do que aqueles de isolados de “*M. abscessus*” (135, 138 e 141) e “*M. bolletii*” (194) (673pb). Como resultado, “*M. massiliense*” pode ser facilmente diferenciado de “*M. abscessus*” e “*M. bolletii*” baseado na análise de PCR do gene *erm(41)*. M: marcador molecular de 100pb. NC: controle negativo.

Bastian e col. (2011) também investigaram a resistência à claritromicina no grupo *M. abscessus* pelo sequenciamento dos genes *rrl* e *erm(41)*. A resistência à claritromicina e à azitromicina foi determinada pela técnica recomendada pelo CLSI (NCCLS, 2003) e pelo Etest com leituras após 14 dias de incubação. Todos os isolados de “*M. massiliense*” foram considerados sensíveis (CIM = 1 µg/mL) e apresentaram o gene *erm(41)* com uma deleção

de dois pb e outra de 274 pb, com exceção de quatro isolados considerados resistentes que apresentavam mutação no gene *rrl*. Os isolados de “*M. abscessus*” apresentaram o gene *erm(41)* intacto, porém com polimorfismos no vigésimo oitavo nucleotídeo (T28), demonstrando resistência induzida a claritromicina (CIM > 16 µg/mL), enquanto os isolados com o polimorfismo C28 mostraram-se sensíveis (CIM = 2 µg/mL), com exceção de dois resistentes com mutação no gene *rrl*. Os isolados de “*M. bolletii*” apresentaram a sequência do gene *erm(41)* similar aos isolados de “*M. abscessus*” com polimorfismo T28. Os autores concluíram que 59% dos isolados do grupo *M. abscessus* eram resistentes a claritromicina por mecanismos de modificações estruturais no gene *rrl* ou pela expressão do gene *erm(41)* e que os isolados sensíveis não apresentavam nenhum destes dois mecanismos.

Devido às diferenças encontradas, Bastian e col. (2011) observaram que as sequências do gene *erm(41)* parecem ser espécie específicas, pois as cepas de “*M. bolletii*” apresentaram resistência e as “*M. massiliense*” sensibilidade a claritromicina. Nesse estudo, os autores não consideraram a classificação desses microrganismos agrupando “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*” em *M. abscessus* subsp. *bolletii* e as cepas de *M. abscessus sensu stricto* em *M. abscessus* subsp. *abscessus*, da mesma forma que outros autores mostraram resultados discordantes de suscetibilidade e não avaliaram a resistência tardia (Leão et al., 2009).

Maurer e col. (2012), diferentemente dos outros autores, investigaram a resistência adquirida a claritromicina analisando os genes *rrl* e *erm(41)*. Os autores relataram que a resistência pode ser mediada por ambos os genes, sugerindo que a presença do gene *erm(41)* não exclui a seleção das mutações do gene *rrl*.

Shallom e col. (2013) tiveram como objetivo descrever uma PCR simples, robusta e de baixo custo para diferenciar “*M. abscessus*”, “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*” analisando cinco genes, sendo um deles o gene *erm(41)*. Diferentemente dos achados dos trabalhos relatados acima, dos 15 isolados de

“*M. massiliense*” estudados, dois apresentaram o gene *erm(41)* conservado, ao invés da esperada deleção de 274 pb. Estes isolados foram testados frente a claritromicina e apresentaram resistência induzida após 14 dias de incubação. Os autores especulam que este perfil pode ter sido originado de uma possível transferência horizontal, na qual transferiu o gene *erm(41)* conservado de um “*M. abscessus*” ou “*M. bolletii*” para estes isolados de “*M. massiliense*”.

Em um recente estudo, Lee e col. (2014) investigaram as características de resistência aos fármacos utilizados no tratamento das infecções causadas pelo grupo *M. abscessus* da Coreia. O teste de suscetibilidade a claritromicina evidenciou que dos isolados de “*M. abscessus*” 31 eram sensíveis, 48 resistentes e 120 com resistência induzida. Dos 199 isolados de “*M. massiliense*”, 184 eram sensíveis e 15 resistentes. Dos três isolados de “*M. bolletii*”, um era resistente e os dois restantes tinham resistência induzida. Os isolados com resistência e resistência induzida apresentaram uma timina na posição 28 no gene *erm(41)*, enquanto os isolados sensíveis apresentaram uma citosina. Destes isolados resistentes, dois isolados “*M. abscessus*” e quatro “*M. massiliense*” apresentaram mutação pontual no gene *rrl*, com altos valores de CIM (> 64µg/ml).

Com base na literatura citada anteriormente, os perfis genéticos conhecidos atualmente para os genes *rrl* e *erm(41)* e sua correlação ao perfil de suscetibilidade expresso para claritromicina foram resumidos e estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Correlação entre os perfis genéticos conhecidos atualmente dos genes *rrl* e *erm(41)* do grupo *M. abscessus* e o perfil de suscetibilidade *in vitro* à claritromicina.

Espécie	Perfil genético		Perfil de suscetibilidade a claritromicina
	<i>erm(41)</i>	<i>rrl</i>	
<i>"M. abscessus"</i>	C28	A2058	S
	T28	A2058	RI
	C28	2058A>G	R
	T28		
<i>"M. bolletii"</i>	C28	A2058	S
	T28	A2058	RI
	C28	2058A>G	R
	T28		
<i>"M. massiliense"</i>	T28 del	A2058	S
	T28 del	2058A>G	R

S: suscetível; RI: resistente induzido; R: resistente; del: deleção de um fragmento de 274 pb no gene *erm(41)*.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os isolados do grupo *Mycobacterium abscessus*, obtidos no período de 2010 a 2011 de pacientes do Estado de São Paulo, quanto ao perfil de resistência a claritromicina pelo padrão de mutação nos genes *erm(41)* e *rrl*.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar os isolados pela técnica de sequenciamento do gene *rpoB*;
2. Descrever as características demográficas dos pacientes de acordo com a espécie.
3. Avaliar o padrão de susceptibilidade dos isolados à claritromicina pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM), a termo (3 dias) e tardiamente (14 dias);
4. Identificar mutações nos genes *erm(41)* e *rrl* pelo método de sequenciamento de Sanger;
5. Verificar a correlação existente entre a espécie identificada e o perfil de suscetibilidade a claritromicina;

3. Material e Métodos

3.1 Isolados

Critérios de inclusão:

- Isolados de origem pulmonar e extrapulmonar, encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) para identificação de espécie no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011, identificados por PRA-hsp65 como *M. abscessus* tipo 1 ou 2.

Critério de exclusão:

- Isolados identificados, por sequenciamento do gene *rpoB*, como outras espécies que não "*M. abscessus*", "*M. massiliense*" ou "*M. bolletii*".

3.2 Manutenção dos isolados

Foram realizados os estoques de todos os isolados, inoculando uma alçada de crescimento bacteriano em criotubo contendo 500 µl de meio Sauton com glicerol a 10% e miçangas de vidro. Após sedimentação, o excesso de meio foi retirado com auxílio de pipeta Pasteur descartável estéril e os tubos foram mantidos a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1$ (Giampaglia et al., 2009). A reativação dos isolados foi realizada retirando de 1-2 miçangas e inoculando-as em meio Lowenstein Jensen (LJ) com posterior incubação a 37°C.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados para todas as reações de PCR foi realizada adicionando uma alçada de crescimento bacteriano, a partir do meio de LJ, em 500 µl de tampão TET (Tris 10mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%) e

mantendo os tubos por 20 minutos a 100°C. Os tubos foram armazenados a -20°C±1 até o momento de utilização (Chimara et al., 2008).

3.4 Teste de suscetibilidade a claritromicina

3.4.1 Avaliação de armazenamento de inóculo e utilização da resazurina

Para avaliar a viabilidade de inóculos armazenados, foi realizado o teste de viabilidade de amostra, recomendado pelo CLSI (2011). Após a inoculação das amostras nas placas de CIM, foram retirados 10 µl do último poço da coluna do controle de crescimento (controle positivo) e adicionados em 9,9 ml de água destilada estéril. Em seguida, foram retirados 100 µl desta diluição e semeados em uma placa de ágar BHI. Incubou-se a placa de BHI a 37°C por três dias e contou-se o número de colônias. O inóculo foi considerado sem alteração de viabilidade quando a contagem de UFC ficou entre 10 e 50 colônias, o que corresponde à concentração de 1×10^5 a 5×10^5 UFC/ml. Este teste foi feito para o inóculo recém-preparado e para aqueles que foram armazenados a 4°C por até sete dias.

A técnica REMA baseia-se na utilização de resazurina, um corante vital, para detectar o crescimento celular (Sarker et al., 2007). Para avaliar a interferência da resazurina no crescimento bacteriano foi realizado um teste de suscetibilidade a claritromicina, com incubação estendida até 14 dias, para 30 amostras, escolhidas aleatoriamente. A leitura visual foi feita no 14º dia, e em seguida foram adicionados 30 µl de resazurina e as placas foram incubadas a 37°C por 6 horas. Os valores de CIM obtidos após a leitura com resazurina foram comparados com os valores de CIM obtidos na leitura visual, na mesma placa. A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle.

3.4.2 Obtenção da CIM dos isolados do estudo

O teste de suscetibilidade de todos os isolados foi realizado no Laboratório de Micobacteriologia da UNESP, Campus Araraquara, em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Pavan.

O protocolo do teste de suscetibilidade foi baseado nas recomendações do CLSI (2011), com algumas modificações necessárias conforme o objetivo deste trabalho. Os isolados foram testados somente contra o fármaco claritromicina e o tempo de incubação foi ampliado para até 14 dias, com leituras nos dias 3, 5, 7, 10 e 14. A solução mãe do fármaco foi diluída em DMSO, considerando a potência informada pelo fabricante (Sigma-Aldrich), alíquotada em criotubos e armazenada a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1$. O teste foi feito em microplacas de 96 orifícios com fundo em U, usando caldo Mueller - Hinton cation ajustado (MHC). A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada para o controle de qualidade dos testes de CIM.

Foram preparadas 90 placas com auxílio de robô modelo BioTek™ Precision™ XS (Fisher Scientific), o qual fez a distribuição de 100 μl de MHC em todos os poços e 100 μl da solução de trabalho da droga na primeira linha da placa. Em seguida, foi realizada uma homogeneização com pipeta e 100 μl foram retirados e adicionados na linha seguinte. O procedimento anterior foi realizado até a última linha para atingir as diluições do fármaco nas placas de acordo com o esquema apresentado na Figura 4.

Após o preparo das placas, as mesmas foram congeladas a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1$ até o momento de uso. A configuração das placas foi desenhada para testar um isolado em cada linha da placa (Figura 4), totalizando oito isolados por placa. Para cada amostra foram feitos três poços de controle de crescimento sem fármaco (CC) e um poço de controle do meio (CM), sem fármaco e sem inóculo. Foram utilizados três poços de CC para a realização da média dos valores de fluorescência obtidos na leitura.

Devido à adição de resazurina, para realizar a leitura do teste, e aos diferentes dias de leitura, para evitar possíveis contaminações, as placas foram separadas em cinco lotes correspondentes aos dias de leitura (Anexo 4). Dessa forma, cada isolado foi testado em cinco placas.

O inóculo foi preparado em MHC, ajustado na densidade ótica da escala 0,5 de McFarland, medida em espectrofotômetro (Celm, Brasil) sob o comprimento de onda de 625 nm e com absorvância entre 0,08 e 0,10, e armazenado a $4^{\circ}\text{C}\pm 2$. Este armazenamento foi uma modificação necessária devido ao tempo e ao esquema de leitura para a realização do teste (Anexo 4). Após o ajuste para a escala 0,5 de McFarland, foram realizadas duas diluições na proporção de 1/10, visando facilitar a manipulação por trabalhar com volumes menores, para atingir a concentração final de 1×10^5 a 5×10^5 UFC/ml no poço. O Anexo 4 apresenta o cronograma com as atividades desenvolvidas na UNESP, Campus Araraquara. Este cronograma foi elaborado e executado devido à necessidade de utilização de estratégia para beneficiar o tempo de inoculação assim como planejar o tempo de leitura, impedindo que as leituras fossem feitas aos sábados e domingos.

Com auxílio de uma pipeta multicanal, 0,1 ml da diluição foi colocado em cada orifício contendo fármaco, atingindo a concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC/ml. Duas colunas sem fármaco foram utilizadas para os controles, sendo uma para controle positivo de crescimento bacteriano (CC) e outra para controle do meio (CM). As placas foram fechadas com tampas de baixa evaporação, lacradas em sacos plásticos, armazenadas em caixa com vedação e incubadas a $37^{\circ}\text{C}\pm 2$.

As leituras dos CIMs foram realizadas nos dias 3, 5, 7, 10 e 14, para verificar a ocorrência de resistência induzida, de acordo com Nash e col. (2009). Para a leitura, utilizou-se a técnica REMA, na qual 30 μl de resazurina foram adicionados em cada orifício, e a placa foi incubada a $37^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 6 horas. Na ausência de mudança de cor nos controles de crescimento (de azul para rosa), as placas foram re-incubadas até o dia seguinte. Os testes foram repetidos nos

casos de ausência de mudança de cor após re-incubação. As leituras foram realizadas com auxílio do fluorímetro SpectraFluor Plus (Tecan), que lê a excitação e emissão de luz em 530 e 590 nm, respectivamente. A unidade apresentada é a Unidade Relativa de Luz (URL), que é convertida para a porcentagem de inibição de crescimento bacteriano (Quadro 2).

Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração do fármaco capaz de inibir a multiplicação de 90% das células. A porcentagem de inibição da multiplicação bacteriana foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando a igual à média da leitura (URL) dos orifícios controle-positivos (orifícios apenas com bactéria e meio de cultura) e b o resultado de cada orifício (URL) com a respectiva diluição do fármaco analisado (Quadro 2).

Quadro 2. Fórmula aplicada no cálculo da porcentagem de inibição bacteriana, utilizando os valores de unidades relativas de luz.

$$100 \times (1 - (b/a)) = \% \text{ de Inibição da Multiplicação Bacteriana}$$

A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada para controle de qualidade de cada lote de placas preparado com fármaco, sendo testada em uma linha de cada placa teste.

De acordo com o manual CLSI (2011), são considerados sensíveis os isolados que apresentarem CIM igual ou inferior a 2 µg/ml, intermediários aqueles que apresentarem CIM igual a 4 µg/ml e resistentes aqueles que apresentarem CIM igual ou superior a 8 µg/ml.

Neste trabalho, consideramos sensíveis os isolados que apresentaram CIM igual ou inferior a 2 µg/ml e resistentes aqueles que apresentaram CIM superior a este valor, considerando os intermediários como resistentes. Esta consideração foi baseada na definição do CLSI (2011) para a categoria de suscetibilidade intermediária, que define que a doença causada por um isolado

com suscetibilidade intermediária só terá um tratamento adequado quando uma dose elevada do fármaco for usada. Neste caso, a próxima concentração é de 8µg/ml, considerada como uma categoria resistente.

Os isolados com sensibilidade no terceiro dia e resistência após o quinto dia foram considerados resistentes induzidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM
B	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM
C	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM
D	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM
E	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM
F	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM
G	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM
H	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC	CC	CC	CM

Figura 4. Esquema representativo da organização das placas de CIM e as concentrações finais de claritromicina em cada orifício em µg/ml. CC= controle de crescimento (controle positivo); CM= controle de meio (controle negativo).

3.4.3 Teste de pré-incubação com claritromicina

A pré-incubação foi utilizada para avaliar a capacidade de induzir a resistência a esse fármaco como método mais rápido em substituição ao CIM estendido por até 14 dias. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito por Nash e col. (2005), no qual os isolados são incubados previamente com claritromicina nas concentrações 0,01µg/ml e 0,1µg/ml por 24 horas e em seguida o teste de

suscetibilidade é realizado de acordo com o recomendado pelo CLSI (2011). A leitura foi realizada com a utilização de resazurina.

Foram selecionados oito isolados para a realização do primeiro teste. Em seguida, somente quatro amostras com perfis de suscetibilidade diferentes (uma sensível, uma resistente e duas com resistência induzida) foram novamente testadas.

3.5 Sequenciamento do gene *rpoB*

Os isolados identificados pelo PRA-*hsp65* como *M. abscessus* tipo 1 e *M. abscessus* tipo 2 (Chimara et al., 2008), foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpoB*, para obter a identificação das três espécies: “*M. abscessus*”, “*M. bolletii*” e “*M. massiliense*”.

O sequenciamento do gene *rpoB* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Adekambi e col. (2003), no qual amplifica um fragmento da região V de 764 pb. Os primers utilizados foram os Myco F (5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3') e Myco R (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC -3'), sob as seguintes condições da PCR: 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 64°C por 30 seg e 72° por 90 seg. A extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos.

A amplificação de DNA foi evidenciada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, o produto de PCR foi purificado utilizando a enzima ExoSap It (Affymetrix), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. Na segunda reação de PCR, o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) foi utilizado para sequenciar as fitas direta e reversa de cada isolado separadamente. A purificação dos produtos foi feita adicionando uma solução de NaOAc/ETOH (NaOAc 3M/ETOH 100%) em cada orifício. A placa foi mantida à temperatura ambiente por 45 minutos ao abrigo da luz. Em seguida a placa foi centrifugada a 2750 x g por 60 minutos a 4°C. A solução foi

completamente retirada e a placa foi centrifugada invertida a 500 x g, para a retirada do excesso de reagente. ETOH 70% foi adicionado e a placa foi centrifugada a 2750 x g por 10 minutos a 4°C. O reagente foi completamente retirado e a placa foi centrifugada invertida a 500 x g, para a retirada do excesso de reagente. As placas prontas foram armazenadas a -20°C até o momento de inserção no sequenciador 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas com auxílio do programa Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths, TX, USA). Os arquivos ab1, gerados pelo sequenciador, foram transferidos para o programa e as sequências consenso foram geradas, utilizando os parâmetros padrões do programa. Foram utilizadas para alinhamento e verificação de erros a sequência de “*M. abscessus*” ATCC 19977 (Genbank number JF346872), “*M. bolletii*” CCUG 50184 (DQ987717. 1) e “*M. massiliense*” CIP 108297 (JEU254721.1). Utilizando a ferramenta BLAST, as sequências foram analisadas por homologia ao banco de sequências GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e foram consideradas as espécies acima de 99,0% de similariedade.

3.6 Sequenciamento do gene *rrl*

O gene *rrl* foi amplificado utilizando os primers SP1 5'-CCTGCACGAATGGCGTAACG e SP2mod 5'-CACCCAGAGGTTTCGTCCGTC (Maurer et al., 2012). A PCR foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 60 seg, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito para o sequenciamento do gene *rpoB*.

As sequências foram analisadas com auxílio do programa Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths, TX, USA). Os arquivos ab1, gerados pelo sequenciador, foram transferidos para o programa e as sequências consenso

foram geradas, utilizando os parâmetros padrões do programa. Para identificar mutações no gene *rrl*, as sequências foram comparadas ao genoma de *M. abscessus* (Genbank número NC_010397.1). Esta cepa, que não apresenta mutação, possui uma adenina na posição 2058, que confere perfil sensível a claritromicina.

3.7 Sequenciamento do gene *erm(41)*

Os primers *erm41f2* e *erm41r2*, descritos por Maurer e col. (2012), foram testados para a amplificação do gene *erm(41)*. No entanto, a região amplificada não contém a região onde ocorre a mutação. Os autores do trabalho foram contactados e relataram problemas com as sequências de primers publicadas, fornecendo novas sequências de primers, tanto para a amplificação do gene (*erm41f2_no* e *erm41r2_no*) como da porção que inclui a região promotora (*ermpromf* e *ermpromr*) (comunicação pessoal).

O alinhamento das sequências dos primers fornecidos mostrou que somente o primer direto corrigido e o primer reverso para a região promotora é que realmente poderiam anelar e amplificar um fragmento do gene *erm(41)* que amplifica a região que pode conter a mutação que confere resistência induzida (Figura 3).

A amplificação do gene *erm(41)* foi realizada utilizando os primers F 5'-GACCGGGCCTTCTTCGTGAT e R 5'-GGAGTTCGTTGTGGATCTGG. Entretanto, o fragmento amplificado corresponde somente à região na qual é possível identificar o polimorfismo (C/T) na posição 28, não abrangendo a região de deleção encontrada em *M. massiliense*.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
erm41f2_an -----
erm41r2_an -----
erm41f2_no -----
erm41r2_no -----
ermpromfor ACCGTGCAGA TGGAGAAGTC -----
ermpromrev -----
MabMC725 GGAGAAGTCG GCGCAGCTG CCGAGGCAGA GCGCCGCGCG GCGTCCACGA GCAGTTCCTC GCGATCCGAC GATTCGCTT CCGAGGCGG CTCGCTCGCC
frag_erm -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
erm41f2_an -----
erm41r2_an -----
erm41f2_no -----GAC CGGGCCCTTC
erm41r2_no -----
ermpromfor -----
ermpromrev -----
MabMC725 AACGACGAGC AGCTCGCCG ACTGCGCAG AAGCTGGCAG GCAACGCCTA AGCGCACGTT CTGACGAAAG AAGGCCCGG TCATGGCGAC CGGGCCCTTC
frag_erm -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
erm41f2_an -----
erm41r2_an -----
erm41f2_no TTCGTGAT--
erm41r2_no -----
ermpromfor -----
ermpromrev -----
MabMC725 TTCGTGATCT ATCGAAACCA GTGCATGCC CCGATATCTT TGGAGCATGG GCATATTTCAT GATGGTGCTG CGTCGTGTCC GGCCAACGTT CCGACGCCA
frag_erm -----ATGGTGCTG CGTGCTGCTC GGCCAACGTT CCGACGCCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
erm41f2_an -----TGG TATCCGCTCA CTGATGA--
erm41r2_an -----
erm41f2_no -----
erm41r2_no -----GGAATC
ermpromfor -----
ermpromrev -----G GAGTTCGTTG TGGATCTGG-
MabMC725 GTGGGGCTGG TATCCGCTCA CTGATGACTG GCGCGCCGCG ATGTCGCCCG AATCCGCTGT TCGCTCAGGG GAGTTCGTTG TGGATCTGGG CCGAGGACAC
frag_erm GT-----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
erm41f2_an -----
erm41r2_an -----
erm41f2_no -----
erm41r2_no GGTGCGGGGA AGTC-----
ermpromfor -----
ermpromrev -----
MabMC725 GGCGCGCTGA CCGCACATCT GGTGCGCGCT GGTGCCAGGG TGCTAGCCGT CGAGCTGCAT CCGGGGCGGG CTCGACACCT TCGTTCACGG TTGCGCGAGG
frag_erm -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
erm41f2_an -----
erm41r2_an -----
erm41f2_no -----
erm41r2_no -----
ermpromfor -----
ermpromrev -----
MabMC725 AAGATGTCCG GATAGCGGAA GCGGACCTGC TCGCCTTCCG GTGGCCCGCA CCGCCATTTC GGTGGTGGC GAGCCCGCCC TACCAAGTCA CCAGCGCACT
frag_erm -----

```


identificadas, já que este gene foi utilizado por alguns autores como ferramenta de identificação.

3.9 Análise demográfica

As informações como nome, idade, sexo, cidade de isolamento e tipo de material clínico dos pacientes foram retiradas do banco de dados do Sistema Integrado de Gestão Hospitalar do IAL (SIGH). Foram considerados casos bacteriológicos (Griffith et al., 2007) somente pacientes com isolados de material clínico estéril e aqueles com mais de um isolamento de mesmo sítio não estéril. Um banco de dados foi elaborado com auxílio do programa Excel Microsoft 2003 e os dados foram analisados utilizando a ferramenta tabela dinâmica para comparação com as variáveis tipo de material clínico, caso bacteriológico, espécie identificada por sequenciamento do gene *rpoB* e genes *rrl* e *erm(41)*. As análises foram realizadas considerando somente um isolado por paciente.

As variáveis foram calculadas e comparadas usando o teste qui-quadrado ou exato de Fisher, quando apropriado. As análises foram conduzidas em Microsoft Excel 2003 e Epi-Info versão 6.04. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Isolados

Foram selecionados 151 isolados, enviados ao Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do IAL, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011, identificados como *M. abscessus* tipo 1 e tipo 2 pelo método PRA-hsp65. No entanto, somente 135 isolados estavam viáveis para análise, devido a contaminações ou ausência de crescimento bacteriano após repique em meio LJ ou meio MHC. Dos isolados viáveis, 78 eram *M. abscessus* tipo 1 e 57 eram *M. abscessus* tipo 2.

4.2 Identificação da espécie e características demográficas

A confirmação da identificação dos 135 isolados foi realizada por sequenciamento do gene *rpoB* e os resultados podem ser observados na Tabela 1. Um isolado, identificado por PRA-hsp65 como *M. abscessus* tipo 1, apresentou resultado de *M. porcinum* e foi excluído da análise. Dentre os 134 isolados incluídos na análise, houve predominância (59,7%) da espécie “*M. abscessus*”.

Tabela 1. Identificação por sequenciamento do gene *rpoB* dos 134 isolados incluídos no estudo.

PRA-hsp65	N Total	Sequenciamento <i>rpoB</i>		
		“ <i>M. abscessus</i> ”	“ <i>M. massiliense</i> ”	“ <i>M. bolletii</i> ”
<i>M. abscessus</i> tipo 1	78	78	0	0
<i>M. abscessus</i> tipo 2	56	2	27	27

Atendendo aos objetivos deste trabalho, as características demográficas dos pacientes foram analisadas de acordo com as espécies identificadas. A

porcentagem de pacientes que se enquadraram aos critérios bacteriológicos foi inferior a 30% para todas as espécies. Dentre os 134 isolados testados, 54 (40,3%) foram obtidos de 23 pacientes que atenderam aos critérios bacteriológicos de caso (Griffith et al., 2007). Três pacientes tiveram a MCR isolada de sítios estéreis (dois de sangue e um de linfonodo) e 20 pacientes tiveram dois ou mais isolados obtidos de amostras de origem pulmonar.

Portanto, dos 134 isolados foram identificados 105 pacientes, considerando para análise somente um isolado por paciente. Os dados demográficos estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas dos 105 pacientes com isolados identificados como *M. abscessus* pelo método PRA-*hsp65* no Instituto Adolfo Lutz, 2010-2011 e confirmados pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.

Característica	Espécie identificada por sequenciamento do fragmento do gene <i>rpoB</i>		
	Nº (%)		
	" <i>M. abscessus</i> " (n=62)	" <i>M. bolletti</i> " (n=20)	" <i>M. massiliense</i> " (n=23)
Idade média	52±19	51±20	48±19
Sexo			
Masculino	37 (60)	11 (55)	12 (52,2)
Feminino	25 (40)	9 (45)	11 (47,8)
Localidade Unidade de Saúde			
Cidade SP	18(29)	8 (40)	9 (39,1)
Grande SP	0	0	0
Interior estado SP	36 (58)	12 (60)	14(60,9)
Litoral estado SP	8 (13)	0	0
Casos confirmados*	15 (24,2)	5 (25)	3 (10,7)

*Casos confirmados bacteriologicamente, de acordo com ATS (Griffith et al., 2007)

A idade média dos pacientes com "*M. abscessus*" foi maior que a dos pacientes com isolamento de "*M. massiliense*" (p=0,01). No entanto a diferença

não foi estatisticamente significativa entre pacientes com “*M. abscessus*” e “*M. bolletii*” ($p=0,07$).

Houve predominância do sexo masculino nos pacientes com isolamento de qualquer espécie, embora não tenha sido evidenciada diferença estatisticamente significativa ($p=0,09$).

O isolamento de “*M. abscessus*” foi maior em unidades de saúde do interior do Estado de São Paulo ($p=0,03$) enquanto que essa associação não foi observada para pacientes com isolamento das outras espécies ($p=0,20$). É importante observarmos que não houve isolamento de nenhuma das espécies em unidades de municípios da grande São Paulo. No litoral, foram isoladas somente amostras de “*M. abscessus*”.

4.3 Teste de suscetibilidade

4.3.1 Avaliação de armazenamento de inóculo e utilização da resazurina

Na leitura do teste de viabilidade da amostra, para o inóculo recém-preparado, foram observadas 50 UFC. Para o inóculo armazenado a 4°C por sete dias foram observadas 25 UFC. Os valores encontrados estão dentro da variação permitida para o teste.

Em relação à padronização do uso da resazurina, na Tabela 3 estão apresentados os valores de CIM na leitura visual após 14 dias de incubação e na leitura após incubação com resazurina.

Tabela 3. Avaliação do teste de suscetibilidade à claritromicina com o uso de resazurina, comparando os valores de CIM lidos visualmente com os valores de CIM obtidos após utilização do corante resazurina, após 14 dias de incubação.

Isolado	CIM leitura visual (µg/mL)	CIM Resazurina (µg/mL)	Espécie
1	16	8	" <i>M. abscessus</i> "
2	4	4	" <i>M. abscessus</i> "
3	16	16	" <i>M. bolletii</i> "
4	16	8	" <i>M. abscessus</i> "
5	32	32	" <i>M. abscessus</i> "
6	4	4	" <i>M. abscessus</i> "
7	8	4	" <i>M. bolletii</i> "
8	<0,5	<0,5	" <i>M. massiliense</i> "
9	8	1	" <i>M. bolletii</i> "
10	16	8	" <i>M. bolletii</i> "
11	8	8	" <i>M. abscessus</i> "
12	8	8	" <i>M. bolletii</i> "
13	32	32	" <i>M. abscessus</i> "
14	16	4	" <i>M. abscessus</i> "
15	<0,5	<0,5	" <i>M. massiliense</i> "
16	8	4	" <i>M. abscessus</i> "
17	<0,5	<0,5	" <i>M. massiliense</i> "
18	16	16	" <i>M. bolletii</i> "
19	16	16	" <i>M. bolletii</i> "
20	16	16	" <i>M. massiliense</i> "
21	64	≥64	" <i>M. abscessus</i> "
22	8	8	" <i>M. abscessus</i> "
23	8	8	" <i>M. abscessus</i> "
24	32	32	" <i>M. abscessus</i> "
25	32	32	" <i>M. abscessus</i> "
26	≥64	≥64	" <i>M. abscessus</i> "
27	16	16	" <i>M. bolletii</i> "
28	8	8	" <i>M. abscessus</i> "
29	64	64	" <i>M. abscessus</i> "
30	<0,5	<0,5	" <i>M. massiliense</i> "
controle	4	4	<i>S. aureus</i>

1 log de diferença; mais de um log de diferença; indeterminado

Podemos observar que 22 (73,3%) amostras apresentaram mesmo valor de CIM quando lidos visualmente e com a utilização de resazurina, enquanto oito (26,7%) amostras apresentaram valores de CIM discordantes entre os dois

métodos de leitura. Os padrões de discordância foram diferentes entre as amostras, das quais cinco (16,6%) amostras tiveram uma diluição de diferença entre as leituras, enquanto duas (6,7%) amostras apresentaram mais de uma diluição de diferença, observando que os valores de CIM lidos com o uso de resazurina foram menores que aqueles lidos visualmente. Considerando a definição de resistência, as diferenças obtidas não interferiram na interpretação dos resultados, com exceção para a amostra 9, onde a leitura com resazurina levou a um resultado falso sensível, e para a amostra 21 que não é possível determinar a diferença de diluição devido a concentração máxima utilizada ser de 64 µg/ml.

A leitura da cepa padrão utilizada como controle não teve alteração no valor de CIM obtido nas leituras visual e com resazurina. O CLSI (2011) recomenda que os valores dessa cepa, no teste a claritromicina, devem variar entre 0,12 e 0,5 µg/ml, em uma leitura após três dias de incubação, o que ocorreu no teste inicial da cepa controle (0,5 µg/ml). No teste realizado, a cepa padrão teve um CIM elevado, pois foi lida com 14 dias de incubação, assim como os isolados testados. Isso mostrou que a cepa continuou viável, demonstrado por repique sucessivo ao teste, e que a utilização da resazurina não alterou os resultados.

4.3.2 Obtenção da CIM dos isolados do estudo

O teste de suscetibilidade à claritromicina foi realizado para os 134 isolados. Após a leitura do CIM no terceiro dia, 99 (94,3%) isolados permaneceram suscetíveis a claritromicina e somente seis (5,7%) isolados foram resistentes (Tabela 4). Os isolados provenientes de mesmo paciente tiveram o mesmo perfil de suscetibilidade, com exceção de três pacientes. O primeiro paciente possui três isolados identificados como "*M. abscessus*", sendo que dois destes isolados apresentaram resistência induzida e um apresentou resistência. O segundo paciente possui dois isolados identificados como "*M.*

abscessus”, sendo que um dos isolados apresentou suscetibilidade e o outro apresentou resistência. O último paciente possui três isolados identificados como “*M. abscessus*”, sendo que dois apresentaram resistência induzida e um apresentou suscetibilidade.

Entre os 99 isolados suscetíveis a claritromicina, 68 (64,8%) apresentaram resistência induzida (Tabela 5). Desses, sete (10,3%) revelaram resistência a partir do dia 5, 10 (14,7%) no dia 7, 34 (50%) no dia 10 e 17 (25%) no dia 14.

Foi observada grande diferença entre as espécies em relação à porcentagem de isolados com resistência induzida. “*M. abscessus*” e “*M. bolletii*” apresentaram as maiores taxas (80,6% e 80,0%, respectivamente). “*M. massiliense*” apresentou uma taxa bem inferior (8,7%) (Tabela 5).

A cepa de controle de qualidade (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) apresentou resultado esperado de acordo com o protocolo padrão estabelecido pelo CLSI (2011).

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade a claritromicina após três dias de incubação, conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.

Espécie	N	Suscetibilidade a claritromicina	
		S N (%)	R N (%)
“ <i>M. abscessus</i> ”	62	58 (93,5)	4 (6,5)
“ <i>M. massiliense</i> ”	23	23 (100)	0
“ <i>M. bolletii</i> ”	20	18 (90)	2 (10)
Total	105	99 (94,3)	6 (5,7)

S: suscetível (CIM \leq 2 μ g/mL); R: resistente (CIM > 2 μ g/mL).

Tabela 5. Perfil de suscetibilidade a claritromicina após 14 dias de incubação, conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.

Espécie	N	Suscetibilidade a claritromicina		
		S (%)	R (%)	RI (%)
<i>"M. abscessus"</i>	62	8 (12,9)	4 (6,5)	50 (80,6)
<i>"M. massiliense"</i>	23	21 (91,3)	0	2 (8,7)
<i>"M. bolletii"</i>	20	2 (10)	2 (10)	16 (80)
Total	105	31 (29,5)	6 (5,7)	68 (64,8)

S: suscetível; R: resistente; RI: resistente induzido.

Os isolados com valores de CIM maiores que 2 µg/ml e menores que 8 µg/ml foram analisados para avaliar o impacto da classificação de resistência utilizada no presente estudo. De acordo com a classificação do CLSI (2011), três isolados (2,86%) apresentaram resultado intermediário a claritromicina (Tabela 6). Os isolados apresentaram CIM igual a 2,967 e 4,987 µg/ml para *"M. abscessus"* e 2,602 µg/ml para *"M. bolletii"* no terceiro dia de leitura. No entanto, todos apresentaram leitura acima de 8 µg/ml após o quinto dia de leitura.

Tabela 6. Perfil de suscetibilidade a claritromicina após três dias de incubação de acordo com a classificação do CLSI e conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.

Espécie	N	Suscetibilidade a claritromicina		
		S (%)	I (%)	R (%)
<i>"M. abscessus"</i>	62	58 (93,5)	2 (3,25)	2 (3,25)
<i>"M. massiliense"</i>	23	23 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>"M. bolletii"</i>	20	18 (90)	1 (5)	1 (5)

S: suscetível (CIM ≤ 2µg/mL); intermediário (CIM = 4µg/mL); R: resistente (CIM ≥8 µg/mL).

4.3.3 Teste de pré-incubação com claritromicina

Neste teste, nenhuma das concentrações foi capaz de desencadear a resistência induzida (CIM>2µg/ml), a qual foi observada no teste de suscetibilidade a claritromicina por um período de até 14 dias de incubação (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado de CIM de isolados pré-incubados com claritromicina nas concentrações de 0,01µg/ml e 0,1µg/ml por um período de 24 horas.

Isolado	CIM(µg/ml)			Interpretação CIM com leitura em 14 dias, sem incubação prévia
	Pré-incubação com 0,01µg/ml	Pré-incubação com 0,1µg/ml	Controle*	
1	1	2	≤0,5	RI
2	≤0,5	≤0,5	≤0,5	S
3	≤0,5	≤0,5	≤0,5	S
4	≤0,5	≤0,5	≤0,5	S
5	≤0,5	2	≤0,5	RI
6	>64	>64	>64	R
7	≤0,5	2	≤0,5	RI
8	2	2	≤0,5	RI

S: suscetível; R: resistente; RI: resistente induzido. * Teste realizado de acordo com o CLSI (2011).

Frente a estes resultados, testou-se a pré-incubação com claritromicina na concentração de 0,1µg/ml por 24, 72 e 120 horas para quatro amostras com perfis de suscetibilidade diferentes (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado de CIM dos isolados pré-incubados com claritromicina na concentração de 0,1 µg/ml por 24, 72 e 120 horas.

Isolado	CIM (µg/ml)				Controle*	Interpretação CIM com leitura em 14 dias, sem incubação prévia
	Pré incubação 24 horas	Pré incubação 72 horas	Pré incubação 120 horas	14 dias		
1	≤0,5	8	8	>64	≤0,5	RI
2	>64	>64	>64	>64	>64	R
3	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	S
4	≤0,5	4	4	>64	≤0,5	RI

S: suscetível; R: resistente; RI: resistente induzido. * Teste realizado de acordo com o CLSI (2011).

A pré-incubação com claritromicina na concentração de 0,1 µg/ml por um período de 72 horas foi capaz de induzir a resistência dos dois isolados que também apresentaram resistência induzida no teste de suscetibilidade com incubação estendida por 14 dias. As outras amostras apresentaram mesmo perfil de suscetibilidade para ambos os testes.

4.4 Sequenciamento dos genes *erm* (41) e *rrl*

O sequenciamento dos genes *erm*(41) e *rrl* foi realizado para todos os isolados identificados como “*M. abscessus*”, “*M. bolletii*” e “*M. massiliense*” pelo sequenciamento do gene *rpoB*. Nas Tabelas 9 e 10 foram comparados o perfil genético dos isolados com o perfil de suscetibilidade a claritromicina após 3 e 14 dias, respectivamente.

Tabela 9. Perfil genético dos genes *rrl* e *erm(41)* e resultados de CIM após três dias de incubação conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.

CIM		≤ 2 µg/ml				>2 ug/ml			
Leitura dia 3		S				R			
Perfil de suscetibilidade									
Perfil genético	<i>rrl</i> <i>erm(41)</i>	A 2058 C28	A 2058 T28	A2058G C28	A2058G T28	A 2058 C28	A 2058 T28	A2058G C28	A2058G T28
Espécie	" <i>M.abscessus</i> " (n=80)	6	70	0	0	0	3	0	1
	" <i>M.massiliense</i> " (n=27)	0	27	0	0	0	0	0	0
	" <i>M. bolletii</i> " (n=27)	0	25	0	0	0	2	0	0

S: suscetível; R: resistente; RI: resistente induzido.

Tabela 10. Perfil genético dos genes *rrl* e *erm(41)* e resultados de CIM após 14 dias de incubação conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.

CIM		≤ 2 µg/ml				>2 ug/ml				>2 ug/ml			
Leitura dia 14		S				R				RI			
Perfil de suscetibilidade													
Perfil genético	<i>rrl</i> <i>erm(41)</i>	A2058 C28	A2058 T28	A2058G C28	A2058G T28	A2058 C28	A2058 T28	A2058G C28	A2058G T28	A2058 C28	A2058 T28	A2058G C28	A2058G T28
Espécie	" <i>M.abscessus</i> " (n=80)	5	5	0	0	0	3	0	1	1	65	0	0
	" <i>M.massiliense</i> " (n=27)	0	25	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	" <i>M. bolletii</i> " (n=27)	0	4	0	0	0	2	0	0	0	21	0	0

S: suscetível; R: resistente; RI: resistente induzido.

Foram considerados somente os resultados de CIM após 14 dias de incubação e as espécies identificadas pelo sequenciamento do gene *rpoB* para análise. Em relação à espécie “*M. abscessus*”, observamos que, dos isolados sensíveis, cinco apresentaram o perfil genético de sensibilidade, apresentando uma adenina na posição 2058 no gene *rrl* e o polimorfismo C28 no gene *erm(41)*. Os outros cinco isolados sensíveis apresentaram o polimorfismo T28 no gene *erm(41)*. Em relação aos isolados com resistência induzida, apenas um apresentou perfil diferente do esperado, apresentando o polimorfismo C28 no gene *erm(41)*, enquanto os 65 isolados restantes apresentaram perfil esperado, com o polimorfismo T28 e uma adenina na posição 2058 do gene *rrl*. Dentre os isolados resistentes (n=4), somente um apresentou o perfil de resistência esperado, apresentando a mutação A>G na posição 2058 do gene *rrl*.

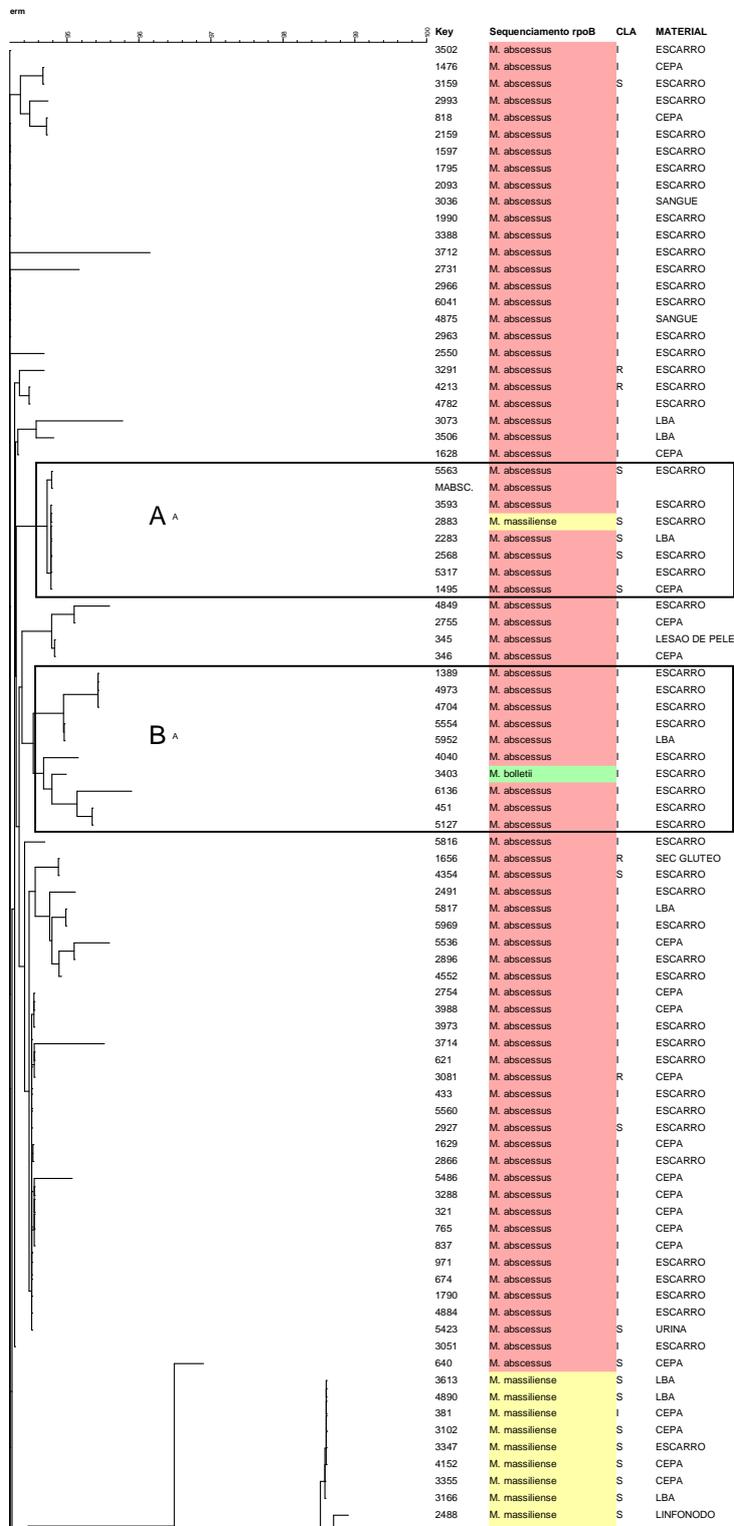
Os isolados sensíveis de “*M. bolletii*” apresentaram perfil genético discordante do esperado, apresentando o polimorfismo T28 no gene *erm(41)*, enquanto aqueles que apresentaram resistência induzida possuem o polimorfismo T28. Entretanto, os isolados resistentes apresentaram perfil genético diferente do esperado, apresentando uma adenina na posição 2058 do gene *rrl*.

Todos os isolados sensíveis de “*M. massiliense*” apresentaram o polimorfismo T28 no gene *erm(41)*, entretanto não foi identificada a deleção de 274 pb devido aos primers utilizados, que não permitiram a amplificação de todo o fragmento. Os isolados com resistência induzida apresentaram perfil esperado com o polimorfismo T28.

4.5 Análise das sequências do gene *erm(41)*

O dendrograma elaborado a partir das sequências obtidas do gene *erm(41)* revelou que existe um agrupamento entre isolados de mesma espécie (Figura 6). Apenas quatro isolados não foram corretamente agrupados (2883, 3403, 979 e 1189). O isolado 2883, que possui o perfil C28, foi agrupado

juntamente com os isolados com este mesmo perfil, apesar de pertencerem a espécies diferentes (Figura 6A). O isolado 3403 está agrupado com outros nove isolados, porém a única característica de semelhança foi o padrão de resistência induzida entre os isolados (Figura 6B). Os isolados 979 e 1189 possuem a deleção de 2pb nas posições 61 e 62, exatamente como todos os isolados de "*M. massiliense*" do estudo.



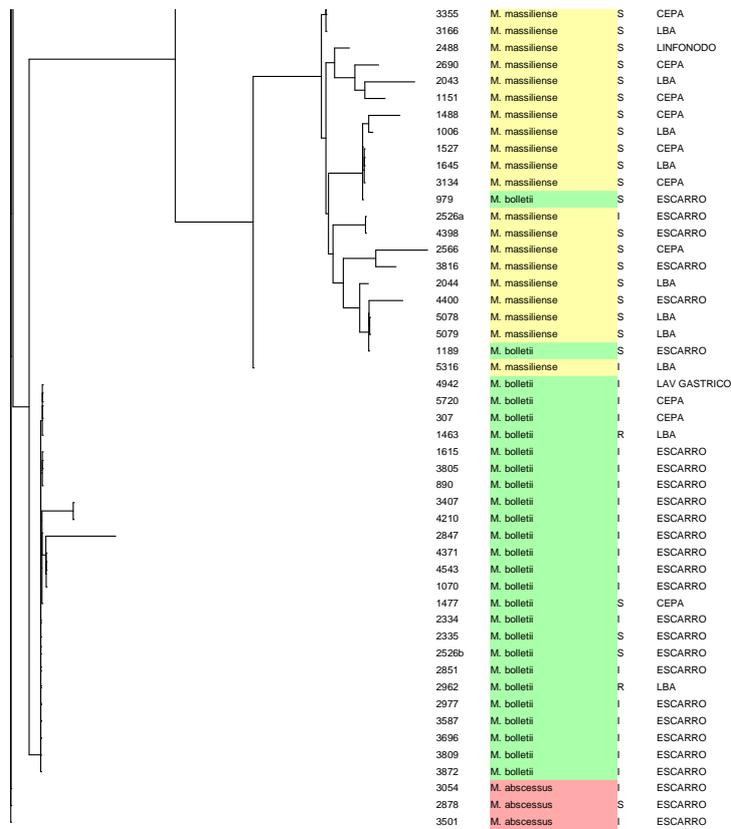


Figura 6. Dendrograma de isolados do grupo *M. abscessus sensu lato* baseado nos resultados de sequenciamento do gene *erm(41)*, criado com auxílio do programa Bionumerics versão 7.1, pelo método neighbor-joining. A sequência de referência usada foi de *M. abscessus* MAB30 (Genbank nº EU590129). A: agrupamento de isolados “*M. abscessus*” C28 com elevada similaridade a um isolado identificado como “*M. massiliense*” C28. B: A: agrupamento de isolados de “*M. abscessus*” com elevada similaridade a um isolado identificado como “*M. bolletii*”.

5. Discussão

M. abscessus é uma das espécies de MCR mais frequentemente isolada, sendo responsável por cerca de 80% das infecções pulmonares causadas por este grupo (Costa et al., 2009; Jeon et al., 2009; Gayathri et al., 2010; Medjahed et al., 2010; Maurer et al., 2012). Neste trabalho, foram selecionados 151 isolados identificados como *M. abscessus* tipo 1 e tipo 2 pela técnica PRA-*hsp65*, encaminhados por laboratórios públicos do Estado de São Paulo para o IAL, no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2011.

A prevalência das espécies do grupo *M. abscessus sensu lato* é variável de acordo com a distribuição geográfica (Koh et al., 2011). Em um estudo realizado na Coreia do Sul, "*M. massiliense*" foi identificado em 46,5% e "*M. bolletii*" em 1,6% dos 144 isolados estudados (Kim et al., 2008). Koh e col. (2011) estudaram 158 isolados de *M. abscessus* provenientes de pacientes atendidos em um hospital em Seoul, Coreia, dos quais 81 (55,0%) foram identificados como "*M. massiliense*" e dois (1,0%) como "*M. bolletii*", corroborando com os dados anteriores. Nos Estados Unidos, Zelazny e col. (2009) estudaram isolados de *M. abscessus* de pacientes monitorados pelo National Institute of Health e observaram que as prevalências de "*M. massiliense*" e "*M. bolletii*" eram de 25,0% e 5,0%, respectivamente. Em outros estudos realizados na Holanda (van Ingen et al., 2009b) e França (Roux et al., 2009) a prevalência destas espécies foi muito semelhante, com cerca de 22,0% de isolados de "*M. massiliense*" e 18,0% de "*M. bolletii*". Estes dados diferem daqueles encontrados na Coreia (Kim et al., 2008; Koh et al., 2011), onde quase metade dos isolados do grupo *M. abscessus sensu lato* foram identificados como "*M. massiliense*", enquanto "*M. bolletii*" foi identificado em uma minoria de casos (2,0%). Em um estudo de dez anos sobre a epidemiologia das MNT, Chou et al. (2014) encontraram 7,4% de isolados de *M. abscessus* em Queensland, Austrália. Nesse trabalho os autores mostraram que características sócio-ecológicas, econômicas e fatores ambientais estão

associados ao risco de infecção por MNT, explicando assim as variações de prevalências entre as regiões geográficas.

No Brasil, poucos estudos abordam a prevalência das MNT, tornando desconhecida a real prevalência destes organismos no país. Em um estudo de Barreto & Campos (2000) foi analisada a prevalência das micobactérias no Brasil do período de 1994 a 1999. Do total de 431 isolados selecionados, somente 32 (7,4%) foram identificados como *M. abscessus*. Dentre as regiões brasileiras, o Nordeste apresentou maior número de isolamentos, com 13 isolados, e o Sul o menor número, com quatro isolados. Outro estudo realizado por Pedro e col. (2008) levantou o número de isolamentos de MNT realizado pelo IAL de São José do Rio Preto no período de 1996 a 2005. Do total de isolados selecionados (317), somente 1,9% foram identificados como *M. abscessus*, sendo todos isolados de material clínico respiratório.

No Rio de Janeiro, um estudo de Senna e col. (2011) realizou a identificação de micobactérias isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho entre 2001 e 2006. Dois isolados foram identificados como *M. abscessus* tipo 1 pela técnica PRA-*hsp65*, provenientes de um único paciente submetido a cirurgia cardíaca, sugerindo uma contaminação intraoperatória. Outros estudos brasileiros que relatam o isolamento de *M. abscessus* estão associados a surtos ocorridos entre 2004 e 2008, relacionados a infecções nosocomiais após procedimentos médicos invasivos devido à utilização de desinfetantes ineficientes durante a desinfecção dos equipamentos utilizados (Carvalho et al., 2012).

A análise demográfica revelou que a idade média dos pacientes, com qualquer espécie isolada, foi elevada, variando de 52 anos para "*M. abscessus*" a 48 anos para "*M. massiliense*". Além disso, foi observado um maior número de pacientes do sexo masculino. Yoshida e col. (2013), ao avaliarem 143 isolados de *M. abscessus sensu lato* de pacientes de seis distritos do Japão, verificaram que a média de idade dos pacientes foi de 68 anos. No entanto, foram isolados mais "*M. abscessus*" de pacientes do sexo feminino, enquanto

que não houve diferença para pacientes com isolamento de “*M. bolletii*”. Outros autores já observaram uma idade média elevada para casos de MNT. McCallum e col. (2011) realizaram um estudo retrospectivo de casos de MNT do NHS Borders Health Board na Escócia entre 1992 a 2010 e observaram que a idade média dos pacientes analisados foi de 64 anos, com maior número de pacientes do sexo masculino. Os autores acreditam que a elevada idade média pode estar relacionada com uma relativa imunodeficiência existente em pessoas com idade avançada. Mirsaieidi e col. (2014) relatam que as infecções pulmonares causadas por MNT ocorrem em dois diferentes grupos de pacientes. O primeiro grupo é constituído de homens, de meia-idade ou idosos, que apresentam fatores de riscos como abuso de fumo e álcool, doenças pulmonares estruturais e outras comorbidades. O segundo grupo são principalmente mulheres idosas não-fumantes, que não apresentam os riscos descritos anteriormente. Entretanto, é sugerido que uma deficiência de leptina possa estar envolvida na suscetibilidade à MNT destas mulheres. Ou ainda, que o estrógeno possa estar envolvido na proteção contra estas infecções através do aumento da função de macrófagos, assim, mulheres na menopausa teriam essa proteção reduzida (Mirsaieidi et al., 2013).

As infecções causadas pelas espécies do *M. abscessus sensu lato* são de difícil tratamento, principalmente devido à resistência intrínseca desses organismos (Bastian e al., 2011). O macrolídeo claritromicina é o fármaco chave no tratamento, no entanto pode influenciar no desenvolvimento de resistência induzida (Stout & Floto, 2012). Para que este tipo de resistência seja detectada é necessário estender o período de incubação do microrganismo em presença do fármaco. De acordo com Choi e col. (2012), é necessário um grande acúmulo da proteína Erm(41) para que o sítio de ligação do fármaco seja bloqueado. Essa produção não é detectada no teste de suscetibilidade com leitura após incubação por três dias, preconizada pelo CLSI (2011).

No presente estudo, o teste de suscetibilidade a claritromicina foi realizado de acordo com o protocolo recomendado pelo CLSI (2011), com

modificações necessárias para a identificação da resistência induzida encontrada em estudos citados anteriormente (Nash et al., 2009; Bastian et al., 2011; Maurer et al., 2012; Shallom et al., 2013). Dessa forma, a incubação do teste foi estendida por um período de até 14 dias, sendo realizadas leituras em dias determinados. Para obter uma leitura acurada, a técnica REMA foi estabelecida, a qual baseia-se na utilização de resazurina, um indicador de oxido-redução usado para avaliar crescimento celular, principalmente em testes de citotoxicidade (Sarker et al., 2007).

Alguns autores realizaram estudos que comparavam a técnica REMA com outros testes de suscetibilidade a fármacos contra o *M. tuberculosis*, e concluíram que esta técnica apresenta alta especificidade e sensibilidade, além de ser simples, prática e não necessitar de equipamentos sofisticados, permitindo a implementação em laboratórios com recursos limitados (Palomino et al., 2002; Martin et al., 2003; Montoro et al., 2005). A técnica REMA foi recomendada pela Organização Mundial da Saúde para realização de teste de suscetibilidade para *M. tuberculosis* (WHO, 2009).

A avaliação, neste estudo, da padronização da técnica REMA mostrou uma concordância de 73,3% entre as leituras visual e com resazurina. Vinte por cento dos isolados testados apresentaram valores de CIM discordantes quando lidos visualmente e com resazurina. O CLSI (2011) explica que a variação de um log de concentração como resultado do CIM é aceitável em testes de reprodutibilidade. Por isso, a discordância de apenas uma concentração não deve ser considerada como um erro, permanecendo na mesma categoria. A discordância verdadeira encontrada foi de 6,7%, entre os isolados com CIM diferente em mais de um log de concentração. Ao utilizarem resazurina no teste de suscetibilidade para *M. tuberculosis*, Martin e col. (2005) verificaram a robustez do método REMA com leitura visual. No entanto, essa leitura pode não ser precisa, principalmente quando o crescimento bacteriano é muito tênue, dificultando a leitura visual. Baseado neste teste, verificamos a eficiência da leitura do CIM com resazurina, e que uma leitura automatizada

com o auxílio do fluorímetro permitiu determinar com precisão o valor de CIM que inibe 90% do crescimento bacteriano. Em uma leitura sem a utilização do equipamento este valor é aproximado. Além disso, é importante ressaltar que esta técnica foi padronizada somente para o teste de suscetibilidade aos fármacos para *M. tuberculosis* e para algumas espécies de MNT de crescimento lento, o que torna inédito o resultado encontrado no presente trabalho.

O teste de suscetibilidade a claritromicina com incubação estendida por 14 dias permitiu identificar o verdadeiro perfil de suscetibilidade dos isolados, já que 64,8% dos isolados que seriam considerados sensíveis a claritromicina, foram resistentes a este fármaco. Analisando de acordo com a identificação das espécies, observamos que 93,5% dos isolados de "*M. abscessus*" foram sensíveis a claritromicina com três dias de incubação. Entretanto, com um período de incubação estendido, essa porcentagem diminuiu para 12,9% e os restantes 80,6% se tornam resistentes induzidos com um período de incubação estendido. Todos os isolados de "*M. massiliense*" apresentaram sensibilidade a claritromicina quando incubados por três dias, enquanto que com um período de incubação estendido 91,3% dos isolados mantiveram o perfil sensível e um pequeno percentual de isolados apresentou resistência induzida (8,7%). Em relação aos isolados de "*M. bolletii*", 90,0% dos isolados foram sensíveis com três dias de incubação e após 14 dias, 80,0% apresentaram resistência induzida. Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados nos trabalhos de Nash e col. (2009), Bastian e col. (2011), Maurer e col. (2012), Shallom e col. (2013) e Lee e col. (2014), os quais encontraram um número elevado de isolados com resistência induzida para as espécies "*M. abscessus*" e "*M. bolletii*", enquanto que quase a totalidade dos isolados de "*M. massiliense*" apresentou-se sensível, mesmo com um período de incubação estendida.

A análise do CIM em diferentes dias de leitura foi realizada para observar se o período de 14 dias de leitura poderia ser reduzido. A obtenção de 25% isolados resistentes induzidos no 14º dia de leitura mostrou a importância do

período completo na detecção da resistência. Hanson e col. (2014), também verificaram uma porcentagem de isolados que revelou a resistência induzida somente no 14º dia de leitura. Estes resultados mostram a necessidade de modificação no teste de suscetibilidade a claritromicina recomendado pelo CLSI (2011), uma vez que a resistência induzida só é revelada quando a incubação é estendida por 14 dias. O teste pode, então, mostrar uma falsa sensibilidade ao fármaco, acarretando num tratamento inadequado.

O teste de pré-incubação com claritromicina foi realizado para observar se uma incubação prévia com o fármaco era capaz de induzir a resistência como no teste de suscetibilidade a claritromicina com incubação estendida por até 14 dias e, dessa forma, reduzir o tempo de realização do teste. Em um estudo, Nash e col. (2005) avaliaram a capacidade de uma incubação prévia com claritromicina induzir a resistência de cinco isolados identificados como *M. fortuitum*. Os autores observaram que um de seus isolados apresentou um elevado valor de CIM ($\geq 128\mu\text{g/ml}$). Em 2009, estes autores realizaram o mesmo teste para os isolados de *M. abscessus* e observaram que a pré-incubação é capaz de estimular a resistência induzida (Nash et al., 2009).

Observamos que o teste foi capaz de induzir a resistência somente quando os isolados foram pré-incubados na concentração de $0,1\mu\text{g/ml}$ por 72 horas. Apesar deste teste ser realizado em menor tempo (seis dias para pré-incubação e teste), em comparação com o teste com incubação estendida, ele requer uma etapa anterior ao teste de suscetibilidade, tornando-o menos prático. Nash e col. (2009) concluíram que apesar do teste de pré-incubação induzir a resistência, a sua introdução numa rotina diagnóstica não é necessária. No entanto, frente à redução em mais de 50% do tempo de liberação do resultado, essa observação só poderá ser melhor discutida caso um número maior de amostras sejam testadas em condições de rotina.

A partir do sequenciamento dos genes *rrl* e *erm(41)* foi possível correlacionar os polimorfismos encontrados nestes genes com os perfis fenotípicos. Dos isolados de "*M. abscessus*", oito não apresentaram os perfis

genéticos esperados para estes genes, sendo cinco isolados sensíveis com o polimorfismo T28 no gene *erm(41)* e três isolados resistentes com uma adenina na posição 2058 do gene *rrl*. Dos isolados de “*M. bolletii*”, os cinco isolados sensíveis e os dois resistentes não apresentaram perfil genético esperado, apresentando o polimorfismo T28 no gene *erm(41)* e uma adenina na posição 2058 do gene *rrl*. Corroborando com estes dados, Lee e col. (2014) relataram que todos os isolados resistentes estudados apresentaram o polimorfismo T28 no gene *erm(41)*, e que não foi possível identificar isolados resistentes com o polimorfismo C28 no gene *erm(41)* e a mutação 2058A>G no gene *rrl*, como reportado por Bastian e col. (2011). Estes dados sugerem que outros mecanismos de resistência possam estar envolvidos no perfil de suscetibilidade destes isolados, como bombas de efluxo e inativação do fármaco (Vester & Douthwaite, 2001). Em relação aos isolados de “*M. massiliense*”, todos apresentaram o polimorfismo T28 no gene *erm(41)*, entretanto, não foi possível identificar a deleção encontrada nos trabalhos de Kim e col. (2008), Nash e col. (2009), Bastian e col. (2011) e Maurer e col. (2012) devido aos primers utilizados, que permitiram somente a identificação do polimorfismo encontrado neste gene. Shallom e col. (2013) ao proporem um PCR para diferenciação das espécies de *M. abscessus* através do gene *erm(41)*, encontraram dois isolados de “*M. massiliense*” que apresentaram o gene *erm(41)* intacto. Estes autores sugeriram que o gene intacto possa ter sido transferido de “*M. abscessus*” ou “*M. bolletii*” para “*M. massiliense*”, o que poderia explicar os nossos achados de dois isolados de “*M. massiliense*” com resistência induzida. Entretanto, para confirmar que esta resistência induzida esteja relacionada com o gene *erm(41)* para estes isolados, seria necessário o sequenciamento do gene completo.

O sequenciamento do gene *rpoB* permitiu a identificação dos isolados em “*M. abscessus*”, “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*”, enquanto a técnica PRA-*hsp65* permitiu a identificação em *M. abscessus* tipo 1 e *M. abscessus* tipo 2. A identificação correta das espécies é importante devido à suscetibilidade variável, permitindo a escolha de fármacos adequados para o tratamento das

infecções causadas por este grupo (Groote & Huitt, 2006; Adekambi et al., 2006; CLSI, 2011).

Dos 78 isolados identificados como *M. abscessus* tipo 1, todos foram identificados como “*M. abscessus*”, e daqueles identificados como tipo 2, dois foram identificados como “*M. abscessus*”, 27 “*M. massiliense*”, 27 “*M. bolletii*” e um *M. porcinum*. Desta forma, houve uma discordância entre os dois métodos de identificação, que pode estar relacionada com a transferência horizontal de sequências do gene *rpoB* entre as espécies de *M. abscessus sensu lato*, como evidenciada por Macheras e col. (2009).

Neste cenário, o sequenciamento do gene *rpoB* foi uma ferramenta útil na identificação das espécies de MCR quando comparada ao PRA-hsp65. Apesar das espécies “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*” possuírem 96,6% de similaridade na região estudada do gene *rpoB* (Leão et al., 2009), o agrupamento dessas espécies utilizando o gene *erm(41)* dá mais uma prova de que a região do gene *rpoB* utilizada é útil na identificação, como tem sido demonstrada em diversos estudos (Adekambi et al., 2003; Adekambi et al., 2006; Koh et al., 2011).

Muito é discutido sobre a classificação das espécies do grupo *M. abscessus sensu lato*, devido ao elevado nível de similaridade entre as espécies. Leão e col. (2009 e 2010) propuseram a classificação das espécies “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*” como uma única subespécie, *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Posteriormente, Cho e col. (2013) por meio de análises de genomas completos mostraram evidências que suportam a separação de *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* e *M. bolletii*. Essa separação é recomendada pelos autores uma vez que as espécies exibem padrões de suscetibilidade e tratamentos diferentes. No entanto, há isolados que possuem características em comum entre as espécies, fato esse que levou Leão e col. (2010) a propor a união das espécies “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*”. No presente estudo, a análise das sequências do gene *erm(41)* mostraram elevada similaridade entre as sequências de mesma espécie, porém quatro isolados

foram agrupados juntamente com outras espécies por possuírem características semelhantes, como no caso dos isolados 979 e 1189, "*M. bolletii*", que possuem deleções semelhantes às encontradas em "*M. massiliense*". Uma hipótese levantada para a ocorrência dessas inconsistências é a transferência horizontal de genes entre as espécies (Macheras et al., 2011; Sassi & Drancourt, 2014).

A análise gerada pelo dendrograma de similaridade das sequências do gene *erm(41)* permitiu agrupar os isolados de acordo com a espécie identificada por meio do sequenciamento do gene *rpoB*, o que sugere que este gene pode ser utilizado não somente na detecção de resistência como também na especiação desses organismos. Alguns autores, como Kim e col. (2010) e Shallom e col. (2013), demonstraram a utilização do produto de amplificação do gene *erm(41)* como método de identificação e diferenciação entre as espécies "*M. abscessus*" e "*M. massiliense*". Estes autores observaram que, para os isolados de "*M. abscessus*", a banda de amplificação possui 673pb, enquanto para os isolados de "*M. massiliense*" a banda é de menor tamanho, com 397pb. Lee e col. (2014) propuseram uma PCR na qual identifica a suscetibilidade dos isolados frente a claritromicina. Como resultado, há dois perfis, sendo um perfil sensível no qual há a detecção de uma banda de 300pb, e um resistente no qual há duas bandas, uma de 300pb e outra de 522pb. Estes estudos evidenciam a diferença existente nos isolados de "*M. massiliense*" que apresentam o gene *erm(41)* com uma deleção, capaz de ser identificada por meio de uma simples reação de PCR.

A utilização do gene *erm(41)* foi recentemente comprovada por Yoshida e col. (2014), que desenvolveram um método baseado em pirosequenciamento para a identificação rápida das espécies do grupo *M. abscessus sensu lato*. Os autores verificaram que os resultados foram compatíveis aos do sequenciamento de Sanger, porém obtidos com maior rapidez. Isso comprova a hipótese inicial desse trabalho, sobre a utilidade desses dados para o desenvolvimento de um teste molecular rápido. No entanto, ainda são

necessários estudos que comprovem a eficácia desses métodos em condições de rotina diagnóstica.

6. Conclusão

- Houve predomínio da espécie *M. abscessus* (59,7%) no grupo de isolados estudados;
- O método de PRA-*hsp65* foi eficaz para identificar a espécie *M. abscessus* tipo 1, uma vez que todos foram identificados como “*M. abscessus*” pelo sequenciamento do gene *rpoB*;
- A espécie identificada por PRA-*hsp65* como *M. abscessus* tipo 2, compartilha quase que igualmente as espécies de “*M. massiliense*” e “*M. bolletii*”, uma vez que os isolados identificados foram identificados como “*M. massiliense*” (n=27), “*M. bolletii*” (n=27), “*M. abscessus*” (n=2) e um *M. porcinum* pelo sequenciamento do gene *rpoB*;
- Houve predominância do sexo masculino e a média de idade foi moderada, sendo os pacientes com isolados de “*M. abscessus*” com maior média (52 anos);
- A distribuição geográfica das espécies variou no Estado de São Paulo. Não houve isolamentos de *M. abscessus sensu lato* na Grande São Paulo e no litoral do Estado foram encontrados somente isolamentos da espécie “*M. abscessus*”;
- Foram detectados mais casos bacteriológicos causados por “*M. abscessus*” do que pelas demais espécies;
- O teste de suscetibilidade a claritromicina com incubação estendida por até 14 dias permitiu identificar a resistência induzida em 68,7% dos isolados sensíveis pelo teste padrão;

- Os resultados obtidos pelo teste de suscetibilidade a claritromicina com uma incubação estendida por até 14 dias sugerem a necessidade de uma adequação no teste de sensibilidade recomendado pelo CLSI (2011), em razão da elevada porcentagem de isolados com resistência induzida;
- A prévia incubação com claritromicina na concentração de 0,1µg/ml por 72 horas pode ser eficiente em estimular as cepas com resistência induzida, antes da realização do teste de suscetibilidade.
- Os polimorfismos C28 no gene *erm(41)* e A2058G no gene *rrl* foram poucos frequentes. Somente cinco isolados sensíveis a claritromicina apresentaram o polimorfismo C28 no gene *erm(41)* e um isolado resistente apresentou a mutação 2058A>G no gene *rrl*.
- Todos os isolados com resistência induzida apresentaram o polimorfismo T28 no gene *erm(41)*, com exceção de um único isolado de *M. abscessus* que apresentou o polimorfismo C28.
- A maioria dos isolados (97,0%) foi agrupada pela análise de similaridade das sequências do gene *erm(41)* de acordo com a espécie identificada com base no sequenciamento do gene *rpoB*.

7. Referências Bibliográficas

Adékambi, T., Colson, P., Drancourt, M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5699-708.

Adékambi, T., Reynaud-Gaubert, M., Greub, G., Gevaudan, M.-J., La Scola, B., Raoult, D., Drancourt, M. Amoebal co-culture of 'Mycobacterium massiliense' sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2004;42, 5493–5501.

Adekambi, T., Berger P., Raoult D., Drancourt M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(1):133-43.

ANVISA, Ministério da Saúde, Brasil. Nota técnica conjunta nº 01/2009 SVS/MS e ANVISA. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/nota_tecnica_conjunta.pdf. Data de acesso: 10/06/2014.

Bailey, M., Chettiath T., Mankin A.S. Induction of *erm(C)* expression by noninducing antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):866–74.

Barreto, A.M.W., Campos, C.E.D. Micobactérias “Não Tuberculosas” no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária.* 2000;8(1): 23-32.

Bastian, S., Veziris, N., Roux, A., Brossier, F. Gaillard, J., Jarlier, V., Cambau, E. Assessment of Clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm(41)* and *rrl* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):775-81.

Bombarda, S., Chimara, E., Seiscento, M., Oliveira, M.L.V., Ferrazoli, L., Galesi, V.M.N. Recomendações para o diagnóstico e tratamento das micobacterioses não tuberculosas no Estado de São Paulo. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_tb.html. Data acesso: 17/10/2013.

Braun, E., Sprecher, H., Davidson, S., Kassis I. Epidemiology and clinical significance of non-tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(1):96-9.

Bryant, J.M., Grogono, D.M., Greaves D., Foweraker, J., Roddick, I., Inns, T., Reacher, M., Haworth, C.S., Curran, M. D., Harris, S.R., Peacock, S.J., Parkhill, J., Floto, R.A. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2013; 381(9877):1551-60.

Brown-Elliott, B.A., Wallace Jr., R.J. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):716-46.

Brown-Elliott, B.A., Nash, K.A., Wallace, R.J.Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanism, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(3):545-82.

Carvalho, N.F.G., Ferrazoli, L., Riveron, M.B.A., Chimara, E. Caracterização de surtos causados pelo grupo *Mycobacterium abscessus*. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2012;71(2):228-36.

Castro, C. M., Puerto, G., García, L. M., Orjuela, D. L., Pólo, C. L., Garzón, M. C., Ribón, W. Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995 – 2005. *Biomédica.* 2007;27:439-46.

Cassidy, P.M., Hedberg, K., Saulson, A., McNelly, E., Winthrop, K.L. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a challenging epidemiology. *Clin Infect Dis.* 2009;49(12):124-9.

Catherinot, E., Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, J.F., Daffé, M., Perronne, C., Soudais, C., Gaillard, J.L., Rottman, M. Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infection and Immunity.* 2007;75(2):1055–1058.

Chimara, E., Ferrazoli, L., Ueky, S. Y., Martins, M. C., Durham, A.M., Arbeit, R. D., Leão, S. C. Reliable identification of mycobacterial species by PCR restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiology.* 2008;8:48.

Choi, E., Shin, S.J., Won, C., Min, K., Oh, T., Hahn, M., Lee, K., Lee, H., Daley, C.L., Kim, S., Jeong, B., Jeon, K., Koh, W. Macrolide treatment of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* infections and inducible resistance. *Am J Respir Crit Med.* 2012;186(9):917–925.

Cho, Y.J., Yi, H., Chun, J., Cho, S.N., Daley, C.L., Koh, W.J., Jae, Shin S. The genome sequence of 'Mycobacterium massiliense' strain CIP 108297 suggests the independent taxonomic status of the Mycobacterium abscessus complex at the subspecies level. *PLoS One.* 2013 ;8(11):e81560.

Chou, M.P., Clements, A.C.A., Thomson, R.M. A spatial epidemiological analysis of nontuberculous mycobacterial infections in Queensland, Australia. *BMC Infectious Diseases* 2014;14:279.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; *Approved Standard-Second Edition.* NCCLS document M24-A2 (ISBN 1-56238-746-4). Clinical and

Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2011.

Colombo, R.E., Olivier, K.N. Diagnosis and treatment of infections caused by rapidly growing Mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008;29:577-588.

Costa, A.R.F., Lopes, M.L., Leão, S.C., Schneider, M.P.C., Sousa, M.S., Suffys, P.N., Corvelo, T.C.O., Lima, K.V.B. Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Pará, Amazon region, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65(4):358-64.

Costa, A. R. F., Lopes, M. L., Furlaneto, I. P., Sousa, M. S., Lima, K. V. B. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian

Dai, J., Chen, Y., Lauzardo, M. Web-accessible database of hsp65 sequences from *Mycobacterium* reference strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2296-2303.

Duarte, R.S., Lourenço, M.C., Fonseca, L.D., Leão, S.C., Amorim, E.D., Rocha, I.L., Coelho, F.S., Viana-Niero, C., Gomes, K.M., da Silva, M.G., Lorena, N.S., Pitombo, M.B., Ferreira, R.M., Garcia, M.H., de Oliveira, G.P., Lupi, O., Vilaça, B.R., Serradas, L.R., Chebabo, A., Marques, E.A., Teixeira, L.M., Dalcolmo, M., Senna, S.G., Sampaio, J.L. An Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2149-55.

Esteban, J., Martin-de-Hijas, N. Z., Kinnari, T. J., Ayala, G., Fernández-Roblas, R., Gadea, I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiology.* 2008;8:184. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/184>.

Euzéby, J.P. List of bacterial names with stand in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>. Data acesso: 14/01/2014.

Falkinham, J.O. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis.* 2003;9 (7):763-767.

Falkinham, J.O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.* 2009;107(2):356-367.

Gayathri, R., Lily, T.K., Deepa, P., Mangal, S., Madhavan, H.N. Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. *J Postgrad Med.* 2010;56(2):76-8.

Giampaglia, C.M.S., Brito A.C., Martins, M.C., Ueki, S.Y., Latrilha, F.O., Oliveira, R.S., Yamauchi, J.U., da Silva Telles, M.A. Maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* on glass beads. *Ann Clin Lab Sci.* 2009;39(1):51-4.

Greendyke, R., Byrd, T.F. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planctonic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6):2019-26.

Griffith, D.E, Girard, W. M., Wallace, R. J. Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(5):1271-8.

Griffith, D. E., T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M. F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C. F. von Reyn, R. J. Wallace, Jr., and K. Winthrop. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:367-416.

Griffith, D.E. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(2):185-90.

Groote, M.A.D, Huitt, G. Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. *Clin Infect Dis.* 2006;42(12):1756–63.

Haanpera, M., Huovinen, P., Jalava, J. Detection and quantification of macrolide resistance mutations at positions 2058 and 2059 of the 23S rRNA gene by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):457-60.

Hall-Stoodley L., Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):7-10.

Hanson, K.E., Slechta, E.S., Muir, H., Barker, A. Rapid molecular detection of inducible macrolide resistance in *Mycobacterium chelonae-abscessus* strains: a replacement for 14 day susceptibility testing? *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1705-07.

Heginbothom, M.L. The relationship between in vitro drug susceptibility of opportunist mycobacteria and their in vivo response to treatment. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5(6):539-45.

Huang, y., Liu, M., Shen, G., Lin, C., Kao, C., Liu, P., Shi, Z. Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010;43(5):401-6.

Jang, M.A., Koh, W.J., Huh, H.J. Kim, S.Y., Jeon, K., Ki, C.S., Lee, N.Y. Distribution of nontuberculous mycobacteria by multigene sequence-based typing and clinical significance of isolated strains. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1207-12.

Jarand, J., Levin, A., Zhang, L., Huitt, G., Mitchell, J.D., Dayle, C.L. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. *Clin Infect Dis.* 2011;52(5):565-71.

Jarzembowski, J.A., Young, M.B. Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(8):1333-41.

- Jeon K., Kwon O.J., Lee N. Y., Kim B. J., Kook Y.H., Lee S. H., Park Y.K., Kim C.K., Koh W. J. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(9):896-902.
- Kendall, B.A., Winthrop, K.L. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(1):87-94.
- Kim, H.Y., Kook, Y., Yun, Y.J., Park, C.G., Lee, N.Y., Shim, T.S., Kim, B.J., Kook, Y.H. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group isolates. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3384-90.
- Kim, H., Kim, B.J., Kook, Y., Yun, Y., Shin, J.H., Km, B., Kook, Y. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiol Immuno*. 2010; 54(6): 347-353.
- Koh, W., Jeon, K., Lee, N.Y., Kim, B., Kook, Y., Lee, S., Park, Y.K., Kim, C.K., Shin, S.J., Huitt, G.A., Daley, C.L., Kwon, O.J. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:405-410.
- Kusunoki, S., Ezaki, T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1992; 42(2):240-245.
- Leão, S.C., Tortoli, E., Vianna - Niero, C., Ueki, S.Y.M., Lima, K.V.B., Lopes, M.L., Yubero, J., Menendez, M.C., Garcia, M.J. Characterization of mycobacteria from a major brazilian outbreak suggest that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae – M. abscessus* group is needed. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2691-98.
- Leão, S.C., Viana-Niero C., Matsumoto C.K., Lima K.V.B., Lopes M.L., Palaci M., Hadad D.J., Vinhas S., Duarte R.S., Lourenço M.C.S., Kipnis A., Neves Z.C., Gabardo B.M.A., Ribeiro M.O., Baethgen L., Assis D.B., Madalosso G., Chimara E., Dalcolmo M. P. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. *Fut Microbiol*. 2010;5(6):971-80.
- Leão, S.C., Tortoli, E., Euzéby, J.P., Garcia, M.J. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:2311-2313.
- Lee, S.H. Yoo, H.K., Kim, S.H, Koh, W., Kim, K., Park, Y.K., Kim, H.J. The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea. *Ann Lab Med*. 2014; 34(1): 31-37.

Lopes, M.L., Lima, K.V.B., Leão, S.C., Souza, M.S., Santili, L.Q., Loureiro, E.C.B. Micobacterioses associadas a procedimentos médicos invasivos em Belém. Rev Paraense Med. 2005;19(2):87-89.

Macheras, E., Roux, A.L., Ripoll, F., Sivadon-Tardy, V., Gutierrez, C., Gaillard, J.L., Heym, B. Inaccuracy of single target-sequencing for discriminating species of the *Mycobacterium abscessus* group. J Clin Microbiol. 2009;47:2596-600.

Macheras, E., Roux, A.L., Bastian, S., Leão, S.C., Palaci, M., Sivadon-Tardy, V., Gutierrez, C., Richter, E., Rüsç-Gerdes, S., Pfyffer, G., Bodmer, T., Cambau, E., Gaillard, J.L., Heym, B. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. J Clin Microbiol. 2011;49(2):491-99.

Marras, T.K., Chedore, P., Ying, A.M., Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. Thorax. 2007;62(8):661-66.

Martin, A., Camacho, M., Portaels, F., Palomino, J.C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple and inexpensive method. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(11): 3616-19.

Martin A, Morcillo N, Lemus D et al. Multicenter evaluation of colorimetric assays using MTT and resazurin for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. Int J Tuberc Lung Dis 2005;9(8): 901-6.

Maurer, F.P., Rügger, V., Ritter, C., Bloemberg, G.V., Böttger, E.C. Acquisition of clarithromycin resistance mutations in the 23S rRNA gene of *Mycobacterium abscessus* in the presence of inducible *erm(41)*. J Antimicrob Chemother. 2012;67(11):2606-11.

McCallum, A.D., Watkin, S.W., Faccenda, J.F. Non-tuberculous mycobacterial infections in the Scottish Borders: identification, management and treatment outcomes – a retrospective review. J R Coll Physicians Edinb. 2011;41(4): 294-303.

Medjahed, H., Gaillard, J., Reyrat, J. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. Trends Microbiol. 2010;18(3):117-123.

Mirsaeidi, M., Hadid, W., Ericsoussi, B., Rodgers, D. Non-tuberculous mycobacterial disease is common in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. Int J Infect Dis. 2013;14(11): 1000-4.

Mirsaeidi, M., Farshidpour, M., Ebrahimi, G., Aliberti, S., Falkinham III, J.O. Management of nontuberculous mycobacterial infection in the elderly. Eur J Intern Med. 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2014.03.008>.

Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A., Portaels, F., Palomino, J.C. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtiter assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother. 2005;55(4): 500-5.

Moore, M., Frerichs, J.B. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. J Invest Dermatol. 1953;20:133-169.

Nash, K.A. Intrinsic macrolídeo resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel *erm* gene, *erm*(38). Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(10):3053–60.

Nash, K.A., Brown-Elliott, B.A., Wallace R.J. Jr Molecular basis of intrinsic macrolideo resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. J Antimicrob Chemother. 2005;55(2):170-7.

Nash, K.A., Andini, N., Zhang, Y., Brown-Elliott, B.A., Wallace R.J. Jr. Intrinsic macrolídeo resistance in rapidly growing mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(10):3476-8.

Nash, K.A, Brown-Elliott, B.A., Wallace R.J. Jr. A novel gene, *erm*(41), confers inducible macrolídeo resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* from *Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(4):1367-76.

Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J.M., Murray, A., Gicquel, B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):810-818.

Ordway, D., Henao- Tamayo, M., Smith, E., Shanley, C., Harton, M., Troudt, J., Bai, X., Basaraba, R. J., Orme, I. M., Chan, E. D. Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. J Leukoc Biol. 2008;83(6):1502-11.

Padoveze, M.C., Fortaleza, C.M., Freire, M.P., Brandão de Assis, D., Madalosso, G., Pellini, A.C., César, M.L., Pisani Neto, V., Beltramelli, M.M., Chimara, E., Ferrazoli, L., da Silva Telles, M.A., Sampaio, J.L., Leão, S.C. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. J Hosp Infect. 2007;67(2):161-7.

Palomino, J.C., Martin. A., Camacho, M., Ghuerra, H., Swings, J., Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(8): 2720-2.

Pedro, H.S.P., Pereira, M.I.F., Goloni, M.R.A., Ueki, S.Y.M., Chimara, E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. J Bras Pneumol. 2008;34(11): 950-55.

Petrini, B. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. APMIS. 2006;114(5):319-28.

Pitombo, M. B., Lupi, O., Duarte, R. S. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants a nation matter? Rev Bras Ginecol e Obstet. 2009;31(11):529-33.

Pfyffer, G. E. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. Manual of clinical microbiology: Vol 1 2006; pp. 543-572.

Pourahmad, F., Thompson, K. D., Adams, A., Richards, R. H. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction - Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for identification of aquatic mycobacteria. J Microbiol Methods. 2009;76(2): 128 – 35.

Primm, T.P., Lucero C.A., Falkinham J.O., 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2004;17(1):98-106.

Roux, A.L., Catherinot, E., Ripoll, F., Soismier, N., Macheras, E., Ravilly, S., Bellis, G., Vibet, M.A., Le Roux, E., Lemonnier, L., Gutierrez, C., Vincent, V., Fauroux, B., Rottman, M., Guillemot, D., Gaillard, J.L., Herrmann, J. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. J Clin Microbiol 2009;47(12): 4124–8.

Runyon, E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am. 1959;43(1):273-90.

Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007;42(4): 321-4.

Senna, S.G., Marsico, A.G., Vieira, G.B.O., Sobral, L.F., Suffys, P.N., Fonseca, L.S. Identificação de micobactérias não tuberculosas isoladas de sítios estéreis em pacientes em um hospital universitário na cidade do Rio de Janeiro. J Bras Pneumol. 2011;37(4): 521-26.

Shallom, S.J., Gardina, P.J, Timohy, G.M., Yinong, S., Conville, P., Calhoun, L.B., Tettelin, H., Olivier, K.N., Uzel, G., Sampaio, E.P., Holland, S.M., Zelazny, A.M. New rapid scheme for distinguishing the subspecies of the *Mycobacterium abscessus* group and identification of *Mycobacterium massiliense* with inducible clarithromycin resistance. J Clin Microbiol. 2013; 51(9): 2943-49.

Stout, J.E., Floto, R.A. Treatment of *Mycobacterium abscessus*. All macrolides are equal, but perhaps some are more equal than others. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186:822-823.

van Ingen, J., Boeree, M.J., Dekhuijzen, P.N.R., van Soolingen, D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. Clin Microbiol Infect. 2009;15(10):888-93.

van Ingen, J., de Zwaan R., Dekhuijzen, R.P., Boeree, M.J., van Soolingen, D. Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae-abscessus* group isolation in 95 patients. J Infect. 2009;59(5): 324-31(b).

van Ingen, J. Strategies to improve outcome of drug treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. Clin Infect Dis. 2011;52(10):1281-82.

Vester, B., Douthwaite, S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(1):1-12.

Wallace, R.J. Jr, Meier, A., Brown, B.A., Zhang, Y., Sander, P., Onvi, G.O., Bottger, E. C. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40(7):1676-81.

World Health Organization. Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis: report on conclusions and recommendations. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2009.

Wongkitisophon, P., Rattanakaemakon, P., Tanrattanakorn, S., Vachieamon, V. Cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection associated with mesotherapy injection. Case Rep Dermatol. 2011;3(1):37-41.

Yoshida, S., Tsuyuguchi, K., Suzuki, K., Tomita, M., Okada, M., Hayashi, S., Iwamoto, T., Saito, H. Further isolation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and subsp. *bolletii* in diferente regions of Japan and susceptibility of these isolates to antimicrobial agentes. Int J Antimicrob Agents. 2013;42:226-231.

Zelazny, A.M., Root, J.M., Shea, Y.R., Colombo, R.E., Shamputa, I.C., Stock, F., Conlan, S., McNulty, S., Brown-Elliott, B.A., Wallace, R.J Jr., Olivier, K.N., Holland, S.M., Samapio, E.P. Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii*. J Clin Microbiol. 2009;47(7): 1985-95.

Anexo 1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEPIAL)



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepiat@ial.sp.gov.br



São Paulo, 28 de dezembro de 2011.

Protocolo: 102/2011

Registro CEPIAL nº 032/2011 de 27/10/11

Projeto de Pesquisa: "Caracterização genética de cepas de *Mycobacterium abscessus* quanto ao perfil de resistência à claritromicina".

Pesquisador Responsável: Erica Chimara

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião de dezembro de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

Anexo 2. Cronograma de preparação e realização de teste de suscetibilidade à claritromicina na UNESP Campus Araraquara.

Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Segunda - feira	Terça - feira	Quarta - feira	Quinta - feira	Sexta - feira
	Preparação das placas para os dias de leitura 7, 10 e 14	Preparação do inóculo e inoculação nas placas de dias de leitura 7 e 14		
Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Segunda - feira	Terça - feira	Quarta - feira	Quinta - feira	Sexta - feira
Inoculação na placa de dia de leitura 10	Preparação das placas para os dias de leitura 3 e 5	Leitura dia 7		Preparação do inóculo e inoculação nas placas de dias de leitura 3 e 5
Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Segunda - feira	Terça - feira	Quarta - feira	Quinta - feira	Sexta - feira
Leitura dia 3		Leitura dia 5		Leitura dia 10 e 14

Anexo 3. Resultados obtidos para os 134 isolados estudados.

Isolado	Material clínico	Identificação PRA	<i>rpoB</i>	<i>rrl</i>	<i>erm(41)</i>	Suscetibilidade
307	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
321	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
345	Lesão de pele	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
346	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
381	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	I
433	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
451	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
621	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
640	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	S
674	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
765	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
818	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
837	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
890	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
971	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
979	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	S
1006	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
1070	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
1151	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
1189	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	S
1389	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
1463	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	R
1476	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
1477	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	S
1488	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
1495	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	C28	S
1527	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
1597	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
1615	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
1628	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
1629	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
1645	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
1656	Sec glueto	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	R
1790	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
1795	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
1923	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I

1990	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2043	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
2044	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
2093	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2159	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2283	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	C28	S
2334	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
2335	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	S
2488	Linfonodo	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
2491	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2526(a)	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
2526(b)	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
2550	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2566	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
2568	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	C28	S
2690	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
2731	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2754	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2755	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2847	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
2851	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
2866	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2878	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	S
2883	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
2896	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2927	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	S
2962	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	R
2963	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2966	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
2977	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. bolletii</i>	2058A	T28	I
2993	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
3036	Sangue	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
3051	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
3054	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
3073	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	I
3081	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	R
3102	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
3134	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S
3159	Escarro	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	2058A	T28	S
3166	LBA	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. massiliense</i>	2058A	T28	S

3288	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3291	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	R
3347	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
3355	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
3388	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3403	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
3407	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
3501	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3502	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3506	LBA	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3587	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
3593	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	C28	S
3613	LBA	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
3696	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
3712	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3714	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3805	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
3809	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
3816	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
3872	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
3973	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
3988	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4040	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4152	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
4210	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
4213	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058G	T28	R
4354	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	S
4371	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
4398	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
4400	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
4543	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
4552	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4704	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4782	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4849	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4875	Sangue	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4884	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
4890	LBA	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
4942	Lav Gastrico	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
4973	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I

5078	LBA	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
5079	LBA	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	S
5127	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5316	LBA	M. abscessus subsp. bolletii	M. massiliense	2058A	T28	I
5317	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	C28	I
5423	Urina	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	S
5486	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5536	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5554	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5560	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5563	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	C28	S
5720	Escarro	M. abscessus subsp. bolletii	M. bolletii	2058A	T28	I
5816	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5817	LBA	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5952	LBA	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
5969	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
6041	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I
6136	Escarro	M. abscessus subsp. abscessus	M. abscessus	2058A	T28	I