

NATALIA FERNANDES GARCIA DE CARVALHO

Utilização do sistema MGIT 960 TB eXiST como teste de suscetibilidade a fármacos para *Mycobacterium abscessus* e análise de possíveis interferentes genéticos no perfil de resistência

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Erica Chimara

SÃO PAULO

2019

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

Utilização do sistema MGIT 960 TB eXIST como teste de suscetibilidade a fármacos para *Mycobacterium abscessus* e análise de possíveis interferentes genéticos no perfil de resistência/ Natalia Fernandes Garcia de Carvalho. -2019.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Erica Chimara.

1. *Mycobacterium abscessus*.
2. Antibacterianos.
3. Genoma.
4. Preparações farmacêuticas.

SES/CCD/CD-397/2019

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

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

AGRADECIMENTOS

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.

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

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

Aos colaboradores, Sidney Bombarda, Sylvia Leão e Silvia Costa, pela disponibilidade e contribuição para a realização deste trabalho.

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

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

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2014/50094-4 e apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (bolsa de doutorado).

Resumo

As espécies do grupo *Mycobacterium abscessus* (MAG) podem causar infecções em diferentes órgãos e tecidos, sendo *M. abscessus* a terceira micobactéria não tuberculosa mais isolada, e são responsáveis por 80% das infecções pulmonares causadas pelas micobactérias de crescimento rápido (MCR). Suas infecções são de difícil resolução devido a sua resistência intrínseca e adquirida à maioria das classes de antibióticos usualmente utilizados, tornando este grupo de grande preocupação para a saúde pública. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) é recomendado para auxiliar na escolha terapêutica e a única metodologia validada é a concentração inibitória mínima, recomendada pelo Clinical & Laboratory Standards Institute. Este projeto teve como objetivo avaliar o TSA pelo sistema automatizado BACTEC MGIT 960/TB eXiST para isolados do MAG. Além disso, foi avaliada a presença de plasmídeos. A cepa *M. abscessus* ATCC 19977 foi utilizada para desenvolver o protocolo e, subsequentemente, o TSA foi realizado para 31 isolados de MAG frente a quatro antibióticos tanto pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST quanto pelo método padrão REMA. A comparação entre os dois métodos mostrou que não houve erros críticos. No geral, o sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST forneceu corretamente as informações clinicamente relevantes, com a única exceção sendo uma discrepância menor. Todos os isolados testados foram sensíveis (4 µg/mL) a amicacina, com a exceção de um isolado resistente. Para imipenem, todos os isolados foram resistentes (32 µg/mL), enquanto para cefoxitina apenas dois isolados foram sensíveis (16 µg/mL). Em relação a claritromicina, 14 isolados foram sensíveis (2 µg/mL) enquanto os restantes foram resistentes (8 µg/mL). A análise genômica evidenciou que apenas dois isolados apresentaram plasmídeos. O isolado 381 apresentou dois contigs, sendo um deles idêntico ao fago Adler, enquanto o isolado 1189 apresentou um único contig com diversos mecanismos de defesa celular, incluindo uma metalo beta-lactamase. Este estudo descreve um

protocolo de TSA para MCR pelo sistema MGIT 960/TB eXiST e que a aplicação do método a um conjunto de isolados clínicos demonstrou que o sistema é confiável e altamente reprodutível.

Palavras-chave: *Mycobacterium abscessus*, antibacterianos, genoma

Abstract

Species of the *Mycobacterium abscessus* group (MAG) are capable of infecting different types of organs and tissues, being the third most isolated non-tuberculous mycobacteria, and are responsible for 80% of pulmonary infections caused by fast-growing mycobacteria (MCR). Infections caused by MCR are difficult to resolve due to their intrinsic and acquired resistance to most commonly used antibiotic classes, making this group a major public health concern. Drug susceptibility testing (DST) is the minimum inhibitory concentration indicated for therapeutic follow-up, and the only validated methodology is that recommended by the Clinical & Laboratory Standards Institute. This project aimed to evaluate DST by BACTEC MGIT 960/TB eXiST system for MAG isolates. In addition, the presence of plasmids was evaluated. *M. abscessus* ATCC 19977^T was used to develop the protocol, and subsequently DST for four antibiotics was performed against 31 clinical isolates using both REMA method and MGIT system. Comparison between both methods showed that there were no critical errors. Thus, overall, the MGIT system correctly provided the clinically relevant information, with the sole exception being a minor discrepancy. All isolates tested were susceptible (4 µg/mL) to amikacin with the exception of one resistant isolate. For imipenem, all isolates were resistant (32 µg/mL), while for cefoxitin only two isolates were susceptible (16 µg/mL). Regarding clarithromycin, 14 isolates were susceptible (2 µg/mL) while the remaining were resistant (8 µg/mL). Genomic analysis showed that only two isolates presented plasmids. Isolate 381 had two contigs, one of which was identical to Adler phage, while isolate 1189 had a single contig with several cellular defense mechanisms, including a metallo beta-lactamase. This study describes a protocol for performing DST of rapidly growing mycobacteria using the MGIT 960/TB eXiST system and that applying the method to a set MAG of clinical isolates demonstrated that the MGIT 960 system was reliable and highly reproducible.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*, antibacterials, genome

Lista de abreviaturas e siglas

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CC	Controle do crescimento
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CM	Controle de esterilidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAL	Instituto Adolfo Lutz
LJ	Lowenstein Jensen
MCL	Micobactéria de crescimento lento
MCR	Micobactéria de crescimento rápido
MHC	Mueller Hinton Cátion Ajustado
MGIT	Tubo indicador de crescimento de micobactérias
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OADC	Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Ácido oléico
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRA	PCR e análise de restrição
REMA	Método de concentração inibitória mínima com resazurina
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SIGH	Sistema Integrado de Gestão Hospitalar
TSA	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
UC	Unidade de crescimento
UFC	Unidade formadora de colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista
URL	Unidade Relativa de Luz

Lista de Figuras e Quadros

Figura 1. Estrutura da parede celular das micobactérias.	18
Figura 2. Bacilo álcool-ácido resistente pela técnica de Ziehl-Neelsen.	19
Figura 3. Produção de pigmentos por micobactérias em meio de crescimento sólido.	20
Figura 4. Linha do tempo da taxonomia de <i>M. abscessus</i> desde 1950 até os dias atuais.	28
Figura 5. Resumo dos mecanismos de resistência exibidos pelo grupo <i>Mycobacterium abscessus</i> .	35
Figura 6. Mecanismo de ação dos macrolídeos e resistência induzida.	38
Figura 7. Ilustração sobre a produção de metil transferases induzida em presença de claritromicina.	40
Figura 8. Produtos de amplificação da PCR do gene <i>erm(41)</i> das espécies <i>M. abscessus</i> , <i>M. massiliense</i> e <i>M. bolletii</i> .	41
Figura 9. Modelo do peptidoglicano em <i>M. abscessus</i> .	47
Figura 10. Esquema representativo da organização das placas de CIM e as concentrações finais de amicacina (AK), cefoxitina (CEF) e imipenem (IMI) em cada orifício em µg/ml.	56
Figura 11. Curva de crescimento da cepa <i>M. abscessus</i> ATCC 19977 ^T no sistema MGIT 960/TB eXiST.	59
Figura 12. Curva de crescimento do isolado #2566 <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> no sistema MGIT 960/TB eXiST, incluindo o tubo controle (sem fármaco) e aqueles com claritromicina a 0.5, 1, 2, e 8 µg/mL.	61
Figure 13. Curva de crescimento do isolado #1656 <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> no sistema MGIT 960/TB eXiST, incluindo o tubo controle (sem fármaco) e e aqueles com claritromicina a 0.5, 1, 2, e 8 µg/mL.	62
Figura 14. Imagem obtida após Pulsed Field Gel Electrophoresis com detecção de presença de plasmídeos.	72

Figura 15. Ambiente genético do primeiro contig do isolado 381.	74
Figura 16. Ambiente genético do segundo contig do isolado 381.	75
Figura 17. Ambiente genético do primeiro contig do isolado 1189.	77

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tratamento das MNT pulmonares mais frequentes no Estado de São Paulo (2008-2011) de acordo com Bombarda e col. 2011.	32
Tabela 2. Perfil genético dos genes <i>erm</i> (41) e <i>rrl</i> genes e resultados do CIM após 14 dias de incubação dos 32 isolados selecionados.	54
Tabela 3. Definição de suscetibilidade aos fármacos dos isolados do estudo, de acordo com as concentrações críticas estabelecidas pelo CLSI (2018).	56
Tabela 4. Diluições testadas para padronização do inóculo a ser utilizado no sistema BACTEC MGIT/TB eXiST e tempo detecção de crescimento	58
Tabela 5. Concentrações dos fármacos utilizados no teste de suscetibilidade pelo sistema MGIT 960.	63
Tabela 6. Perfil de suscetibilidade aos fármacos dos isolados pelo método REMA, de acordo com a identificação de espécie.	67
Tabela 7. Resultados obtidos pelo método BACTEC MGIT 960/EpiCenter TB eXiST após 15 dias de incubação, de acordo com a espécie identificada.	68
Tabela 8. Comparação dos perfis de suscetibilidade dos fármacos claritromicina, amicacina, cefoxitina e imipenem obtidos pelos métodos REMA e BACTEC MGIT 960/TB eXiST nas concentrações de ponto de corte.	70
Tabela 9. Comparação entre o tempo de detecção da resistência induzida a claritromicina pelo método REMA e o tempo de crescimento no tubo contendo claritromicina a 2.0 mg/L no protocolo MGIT 960.	71
Tabela 10. Comparação do primeiro contig do isolado 381 com o banco de dados BLAST.	73
Tabela 11. Resultado de comparação do contig do isolado 1189 com sequências do banco de dados Blast.	76

Lista de Anexos

Anexo 1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	106
Anexo 2. Anotações dos contigs encontrados nos isolados 381 e 1189.	109

Índice

1. Introdução	17
1.1 Características do gênero <i>Mycobacterium</i>	17
1.2 Identificação	20
1.3 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
1.4 Micobactérias não tuberculosas (MNT)	24
1.5 Grupo <i>Mycobacterium abscessus</i>	26
1.5.1 Clínica	28
1.5.2 Epidemiologia	30
1.5.3 Diagnóstico e Terapêutica	30
1.6 Mecanismos de resistência aos fármacos	34
1.6.1 Mecanismos de resistência aos macrolídeos	36
1.6.2 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos	45
1.6.3 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos	48
1.7 Teste de suscetibilidade aos fármacos	50
2. Objetivo	53
2.1 Objetivo Geral	53
2.2 Objetivos Específicos	53
3. Material e Métodos	54
3.1 Isolados	54
3.2 Manutenção dos isolados	55
3.3 Teste de suscetibilidade aos fármacos pelo método de concentração inibitória mínima com resazurina (REMA)	55
3.4 Protocolo de teste de suscetibilidade aos fármacos pelo MGIT 960/TB eXiST	57
3.4.1 Padronização de inóculo para teste de suscetibilidade MGIT 960/TB eXiST	57
3.4.2 Preparo das soluções de fármacos para teste de suscetibilidade MGIT 960/TB eXiST	62

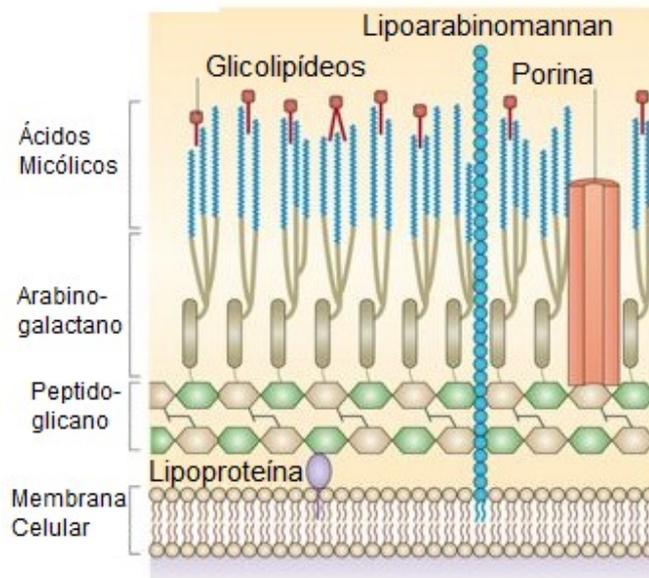
3.4.3	Preparação do teste de suscetibilidade aos fármacos pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST	63
3.4.4	Análise comparativa entre os métodos REMA e MGIT 960/TB eXiST	63
3.5	Análise de interferência de genes plasmidiais na resistência de <i>M. abscessus</i>	64
3.5.1	Detecção da presença de plasmídios nos isolados analisados	64
3.5.2	Sequenciamento de genoma completo	64
3.6	Categorização dos isolados segundo tratamento dos pacientes	65
4.	Resultados	65
4.1	Teste de suscetibilidade aos fármacos pelo método de concentração inibitória mínima com resazurina (REMA)	65
4.2	Teste de suscetibilidade aos fármacos pelo método BACTEC MGIT 960/ TB eXiST	68
4.3	Análise comparativa entre os métodos REMA e BACTEC MGIT 960/TB eXiS	69
4.4	Detecção da presença de plasmídeos nos isolados analisados	72
4.5	Sequenciamento de genoma completo	73
4.6	Categorização dos isolados segundo tratamento dos pacientes	78
5.	Discussão	78
6.	Conclusão	91
7.	Referências Bibliográficas	93
Anexo 1.	Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	106
Anexo 2.	Anotações dos contigs encontrados nos isolados 381 e 1189.	109

1. Introdução

1.1 Características do gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* spp. contempla espécies que diferem amplamente em uma variedade de características, tais como o potencial patogênico em humanos e animais, reservatórios e desempenho de crescimento em meio cultura. Este gênero pode ser dividido em quatro grupos principais, baseado em diferenças fundamentais em epidemiologia, capacidade de causar doença e de crescimento *in vitro*, sendo eles o complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans* e as denominadas Micobactérias Não Tuberculosas (MNT). As espécies desse gênero são aeróbicas e imóveis, não formam esporos e apresentam morfologia pleomórfica, com bacilos ligeiramente curvos, os quais podem produzir filamentos (Pfyffer, 2006; Forbes et al., 2018).

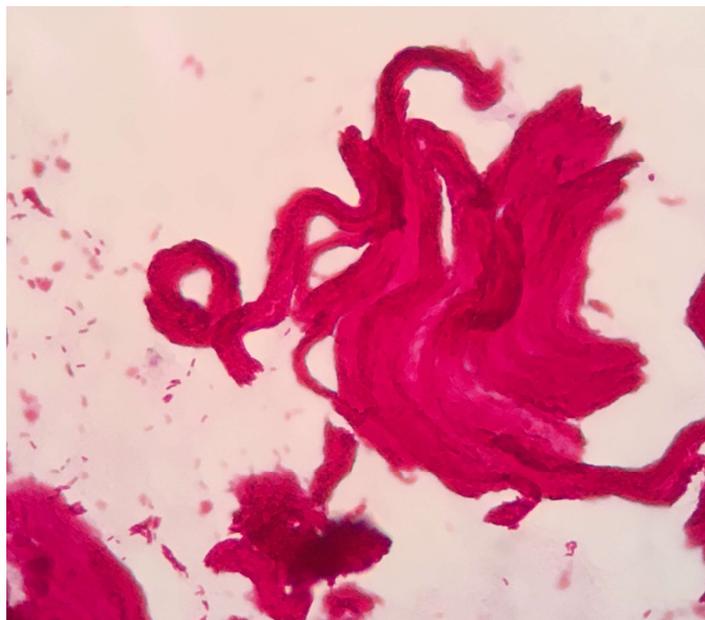
As micobactérias possuem tempo de geração que pode variar entre duas e 20 horas, devido à sua espessa parede celular constituída por complexos lipídicos associados a ácidos micólicos, lipoarabinomanano e manosídeos fosfatidilinositol (Figura 1) (Medjahed et al., 2010). A parede celular também contribui para a fisiologia e virulência desses organismos, pela hidrofobicidade e impermeabilidade a diversas substâncias, incluindo antibióticos e desinfetantes (Jarlier & Nikaido, 1994; Daffe & Drapert, 1998; Falkinham, 2003).



Brown et al., Nat Rev Microbiol, 2015

Figura 1. Estrutura da parede celular das micobactérias.

O alto conteúdo de ácidos micólicos da parede celular destas bactérias confere a característica de resistir à descoloração com álcool-ácido durante a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, sendo denominadas bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Figura 2). 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 (Pfyffer, 2015; Forbes et al, 2018).

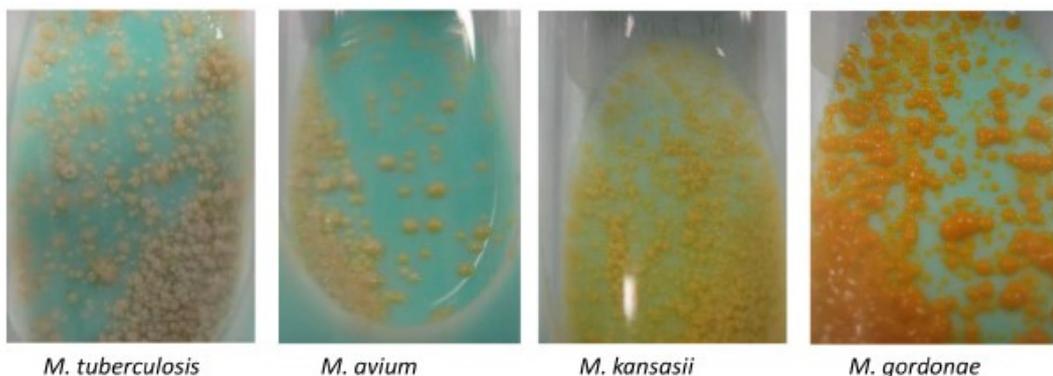


Laboratório de Micobactérias do HCFMUSP, 2019

Figura 2. *Mycobacterium tuberculosis*, coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, microscópico óptico no aumento 1000x, em meio líquido, presença de fator corda.

As micobactérias podem ser classificadas de acordo com o tempo de crescimento a partir de um inóculo padronizado, sendo denominadas micobactérias de crescimento rápido (MCR) as que apresentam colônias visíveis até sete dias de crescimento em meio de cultura sólido, e micobactérias de crescimento lento (MCL), que apresentam colônias visíveis após sete dias. Entretanto, algumas espécies, como *M. leprae*, não são capazes de crescer em meio de cultura (Falkinham, 2015; Forbes et al., 2018).

A produção de pigmento também é uma forma de classificação, sendo 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 (Figura 3) (Runyon et al., 1959).



The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association. Disponível em: <https://jata.or.jp/english/dmrr.html>

Figura 3. Produção de pigmentos por micobactérias em meio de crescimento sólido.

1.2 Identificação

Atualmente, estão descritas 197 espécies e 14 subespécies de micobactérias (Euzéby, 2019). 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 os 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 quatro espécies de micobactérias não tuberculosas (*M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*) e as espécies do complexo *M. tuberculosis*. 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 algumas espécies (46 espécies) impossibilitando uma identificação final conclusiva (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).

Mais recentemente a utilização da espectrometria de massa, com ionização e dessorção a laser assistida por matriz seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (MALDI - TOF), tem sido cada vez mais empregada na identificação das micobactérias. Entretanto, o elevado custo da aquisição deste equipamento permite sua utilização apenas em grandes centros de pesquisas e hospitais (Akyar et al., 2018; Morales et al., 2018; Brown-Elliot et al., 2019; Rotcheewaphan et al., 2019).

Em razão das limitações das metodologias, tanto fenotípicas como 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 29 novas espécies, 14,6% do total de espécies aceitas (Euzéby, 2019).

1.3 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo *M. tuberculosis* contempla as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), *M. caprae*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. mungi* e *M. canetti*, que apresentam 99% de similaridade no gene 16S rRNA e perfis idênticos pelas técnicas de MALDI-TOF MS e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Somoskovi et al., 2008; Forbes et al., 2018). Apesar destas elevadas similaridades moleculares, estas espécies diferem significativamente em morfologia, bioquímica, hospedeiros, capacidade de causar doenças em animais, perfil de suscetibilidade aos fármacos, distribuição geográfica e perfis epidemiológicos (Forbes et al., 2018).

Estes microrganismos são micobactérias de crescimento lento que são reconhecidos como agentes etiológicos da tuberculose (TB), sendo capazes de infectar uma variedade de mamíferos, incluindo humanos. A TB é uma doença granulomatosa progressiva que afeta principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar), com capacidade menos frequente de afetar outros órgãos (extrapulmonar) como intestino, meninges, ossos, articulações, linfonodos, pele e outros tecidos (Lawn & Zumla, 2011; Forbes et al., 2018).

A TB humana é transmitida pela inalação de gotículas contendo o bacilo que atingem os alvéolos pulmonares. Após exposição, apenas 10% dos indivíduos infectados progridem para doença ativa. Entretanto, o patógeno pode

permanecer em estado latente por muitos anos e ser reativado causando a doença. O risco de progressão para doença é maior logo após a infecção inicial e aumenta drasticamente para pessoas co-infectadas com HIV/AIDS ou outras condições de comprometimento imunológico (Lawn & Zumla, 2011; Forbes et al., 2018).

É considerada a doença infecciosa com maior taxa de mortalidade no mundo, sendo estimados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 1,6 milhões de mortes e 10 milhões de novos casos em 2017. Os países em desenvolvimento são os mais vulneráveis, com mais de 95% dos casos reportados. O tratamento da TB tem duração de seis meses e consiste em duas fases, denominadas fase de ataque e fase de manutenção. Na primeira fase, é utilizada a associação de quatro fármacos de primeira linha (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol) e, na segunda fase, são utilizadas somente rifampicina e isoniazida. Apesar de ser uma doença tratável, o tratamento é de difícil adesão pelos pacientes devido ao longo período e aos efeitos colaterais decorrentes da toxicidade dos fármacos utilizados. Como consequência destes fatores, há o desenvolvimento da TB resistente.

A resistência é uma grande ameaça ao controle da doença, que é realizado por medidas e programas estabelecidos por órgãos de saúde pública. Globalmente, em 2018, a OMS estimou que 3,4% dos 7 milhões de casos novos e 18% dos casos previamente tratados de TB apresentavam multirresistência (MR), ou seja, resistência à isoniazida e rifampicina. Destes casos, 9,5% apresentavam TB extensivamente resistente (XR), definida quando uma cepa MR também apresenta resistência a uma fluoroquinolona e a um dos fármacos injetáveis de segunda linha. No Brasil, o mais recente relatório da OMS reporta um número absoluto de 1600 a 2300 casos de TB-MR (OMS, 2019). No entanto, o tratamento destes casos é mais crítico, pois são administrados fármacos mais tóxicos e menos eficazes por um período mínimo de 20 meses. Nos casos de TB-XR, este cenário torna-se mais problemático

devido à carência de opções terapêuticas. Apenas 52% dos pacientes com TB-MR e 28% dos pacientes com TB-XR são tratados com sucesso (OMS, 2018).

1.4 Micobactérias não tuberculosas (MNT)

As MNT são microrganismos onipresentes no meio ambiente, podendo ser recuperadas do solo e fontes naturais de água (água doce e água do mar), bem como reservatórios artificiais (água tratada, sistemas de esgoto, piscinas, equipamentos médicos, entre outros). Estas micobactérias podem formar biofilmes em diversos materiais orgânicos (diferentes tipos de plásticos e silicone) e inorgânicos (vidro, metais etc.) devido a sua hidrofóbica parede celular e sua resistência a desinfetantes, antibióticos e metais pesados. Os biofilmes têm papel fundamental na proteção das MNT contra fatores externos, promovendo a sua colonização (Hall-Stoodley et al., 2005; Forbes et al., 2018).

Biofilmes são formados por comunidades microbianas que aderem a superfícies bióticas ou abióticas, nas quais são envoltas por uma matriz auto-produzida composta por exopolissacarídeos, DNA extracelular, proteínas e lipídios. O modelo clássico de desenvolvimento da formação de biofilme sustenta que células planctônicas móveis se ligam a uma superfície em resposta a uma variedade de sinais ambientais, como exposição a antimicrobianos e estresses físico-químicos (Hall & Mah, 2017).

Os biofilmes são clinicamente importantes porque estão associados a diversos tipos de infecções como endocardite, fibrose cística, pneumonia, cálculos renais infecciosos, infecções do ouvido interno e muitas infecções adquiridas em hospitais por cateteres. Acredita-se que a matrix produzida nos biofilmes funciona como uma barreira protetora contra diversos agentes antimicrobianos, o que contribui para infecções persistentes e crônicas, apesar de antibioticoterapia (Chakraborty & Kumar, 2019).

Devido a onipresença das micobactérias em diversos ambientes, acredita-se que as infecções humanas são adquiridas destas fontes, mas a identificação de uma fonte específica normalmente não é possível (Hall-Stoodley et al., 2005; Forbes et al., 2018).

A presença destas micobactérias pode resultar em colonização, infecção, que podem ser transitórias, intermitentes ou prolongadas, e/ou doença. Já que o contato com as MNT presentes no meio ambiente é constante, estas podem ser detectadas no trato respiratório e gastrointestinal, ou na pele de indivíduos saudáveis. As MNT estão relacionadas a diferentes tipos de doenças em humanos e o espectro de suas infecções pode variar de menor grau, doença cutânea auto-limitada, à infecção generalizada com risco de vida.

Inicialmente, eram somente associadas a doenças em indivíduos imunocomprometidos, entretanto, no ano de 1950, reconheceu-se a importância das MNT na patologia humana como agentes etiológicos de inúmeros quadros nosológicos, acometendo também indivíduos imunocompetentes. São mais frequentemente relacionadas a infecções pulmonares, de pele e linfadenite, e nos últimos anos têm sido apontadas como responsáveis por um elevado número de infecções nosocomiais, após procedimentos médicos invasivos. (Brown-Elliot & Wallace Jr., 2002; Adekambi et al., 2006; Groote & Huitt, 2006; Castro et al., 2007; Padoveze et al., 2007; Esteban et al., 2008; Jarzembowski et al., 2008; Pitombo et al., 2009; Duarte et al., 2009; Medjahed et al., 2010; Gayathri et al., 2010; Wongkitisophon et al., 2011).

Na investigação destas infecções, foi concluído que a 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, foram responsáveis pelos casos (Falkinham, 2003; Groote & Huitt, 2006; van Ingen et al., 2009; Carvalho et al., 2012).

Como as infecções pelas MNT não são consideradas de notificação compulsória em diversos sistemas públicos de saúde no mundo, dados

epidemiológicos e de vigilância são limitados e pouco confiáveis. Estudos recentes mostram o aumento na incidência de infecções causadas por esses microrganismos, atribuído ao reconhecimento de seu potencial patogênico 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 mais frequentemente isoladas estão o complexo *M. avium*, *M. kansasii* e *M. xenopi*, de crescimento lento, e *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, de crescimento rápido (Forbes et al., 2018).

Esses microrganismos são intrinsecamente 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 depende da identificação da espécie, já que cada espécie exibe um padrão diferente de suscetibilidade aos antimicrobianos. O *M. abscessus* é a mais notável e mais intrigante, já que é considerada a espécie mais resistente aos antibióticos utilizados entre todas as MNT potencialmente patogênicas (Gayathri et al., 2010; Medjahed, 2010; Maurer et al., 2012).

1.5 Grupo *Mycobacterium abscessus*

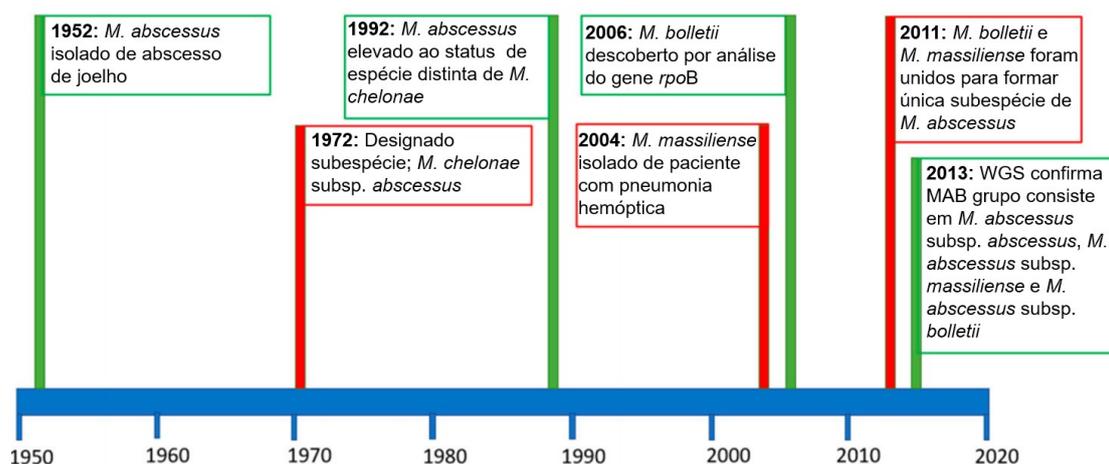
M. abscessus é uma MCR acromógena, com crescimento ideal em temperatura entre 28 e 37°C, apresenta morfologia de colônia heterogênea, variando de rugosa a lisa (Kusunoki & Ezaki, 1992; Petrini, 2006; Catherinot et al., 2007).

Desde sua primeira descrição, por Moore e Frerichs em 1953, esta espécie já passou por diferentes classificações (Figura 4). 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, Adekambi e col. descreveram uma nova espécie, *M. massiliense*, como causa de pneumonia hemoptóica. Posteriormente, em 2006, em estudo sobre MCR, Adekambi 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 e estes dados 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 presença de três subespécies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus*

subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Cho et al., 2013; Tortoli et al., 2016).



Lopeman et al. Microorganisms. 2019 Mar 22;7(3).

Figura 4. Linha do tempo da taxonomia de *M. abscessus* desde 1950 até os dias atuais.

1.5.1 Clínica

As espécies do grupo *M. abscessus* podem causar infecções em diferentes órgãos e tecidos, sendo *M. abscessus* subsp. *abscessus* a terceira espécie de MNT mais isolada, após o complexo *M. avium* e *M. kansasii*, e são responsáveis por 80% das infecções pulmonares causadas por MCR. As infecções pulmonares podem ficar dormentes por anos no hospedeiro, podendo induzir a formação de lesões granulomatosas (Medjahed et al., 2010). Pacientes com infecções pulmonares causadas por *M. abscessus* subsp. *abscessus* geralmente são mulheres brancas com mais de 60 anos, não

fumantes e sem fatores predisponentes. Fatores de riscos que são comumente associados às infecções pulmonares são fibrose cística, bronquiectasias com infiltração pulmonar reticulonodular e, mais raramente, pneumonia lipóide e distúrbios gastrointestinais com vômito crônico (Griffith et al., 1993; Griffith et al., 2007; Medjahed et al., 2010; Maurer et al., 2012; Shallom et al., 2013).

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 que a infecção pode ocorrer por meio da 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).

O grupo *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).

Até recentemente, não havia evidências de transmissão de MNT entre humanos ou de animais para humanos. Entretanto, dois estudos recentes investigaram surtos envolvendo pacientes com fibrose cística por meio de dados epidemiológicos e análises genômicas, os quais sugerem a possível transmissão de *M. abscessus* subsp. *abscessus* entre pacientes (Aitken et al., 2012; Bryant et al., 2013; Bryant et al., 2016; Grogono et al., 2017).

1.5.2 Epidemiologia

A prevalência das infecções causadas pelas MCR, em especial o grupo *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 do grupo *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).

1.5.3 Diagnóstico e Terapêutica

Como o grupo *M. abscessus* e outras MNTs são onipresentes no meio ambiente, incluindo sistema de abastecimento de água, a presença de culturas positivas de trato respiratório nem sempre indica doença pulmonar. Portanto, pacientes devem apresentar sintomas característicos, radiologia compatível, e duas ou mais amostras de escarro positivas com identificação desta espécie, como também a exclusão de outra causa potencial de doença pulmonar (Griffith et al., 2007; Haworth et al., 2017). Caso a coleta de escarro seja dificultada, o lavado broncoalveolar, lavado gástrico ou uma biópsia transbronquial podem ser coletados na investigação de doença pulmonar. A infecção pode ser validada no laboratório por meio de baciloscopia e cultura em meios sólidos e líquidos (Haworth et al., 2017).

Infelizmente, a quimioterapia antimicrobiana para as infecções causadas pelo grupo *M. abscessus* é particularmente difícil devido a sua resistência intrínseca e adquirida à maioria das classes de antibióticos usualmente utilizadas, tornando este grupo de grande preocupação para a saúde pública (Nessar et al., 2012; Lupeman et al., 2019). Além disso, a falta de evidência de que a suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos corresponde à

eficácia *in vivo*, limita ainda mais a escolha terapêutica, o que resulta, na maioria dos casos, em um tratamento mal-sucedido (Lupeman et al., 2019).

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 pelo grupo *M. abscessus*, já que foi o único fármaco a apresentar sólida evidência de eficácia clínica (Griffith et al., 2007; Jeon et al., 2009; Bastian et al., 2011; Maurer et al., 2012; Shallom et al., 2013).

Devido à limitação de dados de estudos controlados e/ou randomizados sobre o tratamento, não há um consenso sobre um regime terapêutico padrão. O tempo e intensidade do tratamento muitas vezes são individualizados, baseando-se no progresso clínico, microbiológico e radiológico, além da toxicidade ser um importante fator na determinação terapêutica (Nathavitharana et al., 2019).

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 (http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/tuberculose/doc/tb11_3mntsb.pdf). Para infecções pelo grupo *M. abscessus*, recomenda-se o uso de claritromicina e amicacina por 6 a 12 meses mais imipenem ou cefoxitina por 2 a 3 meses (Tabela 1) (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 (Nota técnica conjunta nº 01/2009 SVS/MS e ANVISA).

Tabela 1. Tratamento das MNT pulmonares mais frequentes no Estado de São Paulo (2008-2011) de acordo com Bombarda e col. 2011.

Espécie	Tratamento sugerido	Observações
<i>M. kansasii</i>	R + H + E por 18 meses e/ou 12 meses de cultura negativa	Formas cavitárias: associar S por 6 a 12 meses. Resistência á R: Cl
<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. chimarae</i>	Cl + R + E por 18 meses e/ou 12 meses de cultura negativa	Formas cavitárias: associar S por 6 a 12 meses. Resistência á Cl: R + H + E (18 meses) + S ou Am (6 meses)
<i>M. abscessus</i> <i>M. massiliense</i> <i>M. bolletii</i>	Cl + Am (6 a 12 meses) + Imipenem ou Cefoxitina (2 a 3 meses)	Considerar cirurgia sempre que possível. Cursos intermitentes de tratamento podem ser utilizados já que atualmente a doença pulmonar é considerada incurável.
<i>M. fortuitum</i>	Cl + Le por 18 meses + Am (3 a 6 meses) e/ou 12 meses de cultura negativa	-
<i>M. chelonae</i>	Cl + Am (6 a 12 meses) + Imipenem ou Cefoxitina (2 a 3 meses)	Considerar cirurgia sempre que possível.

Am: amicacina 10 a 15mg/kg/dia (máximo 1g/dia, 5x/semana nos 2 primeiros meses e 2x/semana a partir do terceiro mês. Reduzir a dose para pacientes com mais de 60 anos); Cefoxetina: 200mg/dia; Cl: claritromicina 500 mg a 1g/dia; E: etambutol 25mg/kg/dia (máximo: 1,2g); H: isoniazida 5 a 10mg/kg/dia (máximo 300mg); Imipenem: 30mg/kg/dia; Le: levofloxacino 500 a 750 mg/dia R:rifampicina 10mg/kg/dia (máximo 600mg); S: estreptomina 10 a 15mg/kg/dia (máximo 1g/dia, 5x/semana nos 2 primeiros meses e 2x/semana a partir do terceiro mês de tratamento. Reduzir a dose para pacientes com mais de 60 anos).

Com o reconhecimento do aumento de isolamentos do grupo *M. abscessus* em pacientes com fibrose cística, um guia específico de tratamento

e manejo de estratégias para este grupo de pacientes foi desenvolvido (Floto et al. 2016). Em busca de minimizar o desenvolvimento de resistência, pacientes com fibrose cística colonizados com este grupo de microrganismos devem evitar o uso de antibióticos como os macrolídeos, aminoglicosídeos, imipenem e linezolida para tratar outras infecções (Floto et al.,2016).

Strnad & Winthrop (2018) sugerem que o tratamento pulmonar das infecções causadas pelo grupo *M. abscessus* deve ser dividido em duas fases, na qual a fase inicial, chamada de fase de indução, deve incluir um ou mais agentes intravenosos por pelo menos oito semanas dependendo da tolerabilidade do paciente. A fase subsequente, denominada fase de consolidação, é baseada em agentes orais ou inalados por um período de 12 a 18 meses. Além disso, os autores sugerem que uma fase de supressão deve ser considerada em casos de pacientes de alto risco de recidiva. Os macrolídeos orais devem ser utilizados em todas as fases quando as infecções são causadas pela subespécie *M. abscessus* subsp. *massiliense*, devido à suscetibilidade desta subespécie a este grupo de antimicrobianos, enquanto para as subespécies *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* podem ser utilizados quando as opções terapêuticas forem limitadas devido a resistência ou tolerabilidade do paciente (Choi et al., 2012; Strnad & Winthrop, 2018).

Estudos que avaliaram o desempenho do tratamento de pacientes infectados por microrganismos do grupo *M. abscessus*, reportaram uma taxa de sucesso entre 30-50% para *M. abscessus* subsp. *abscessus*, enquanto para *M. abscessus* subsp. *massiliense* esta taxa variou entre 80-90%, devido a disponibilidade do uso de macrolídeos no tratamento (Koh et al., 2014; Koh et al., 2017; Park et al., 2017).

A ressecção cirúrgica do tecido lesionado e/ou de corpos estranhos, como próteses de silicone e outros materiais, tem papel fundamental na cura das infecções (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).

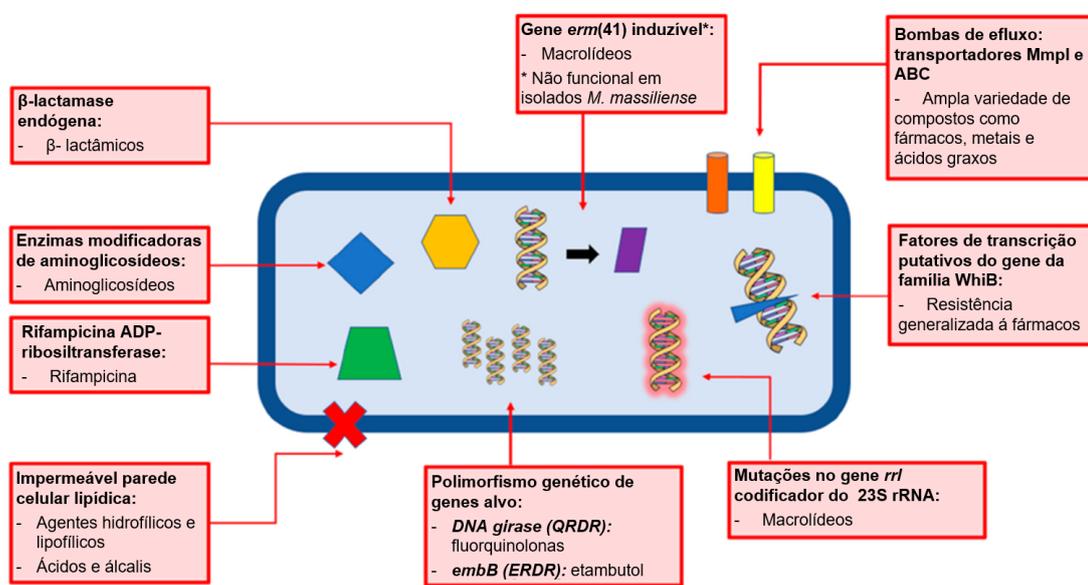
Outros estudos mostram a variabilidade de esquemas terapêuticos e a dificuldade de obtenção da cura. Em um estudo envolvendo 107 pacientes com doença pulmonar por *M. abscessus* subsp. *abscessus*, Jarand e col. (2011) mostraram a variabilidade de tratamentos empregados. Foram utilizados 16 fármacos 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 a baixa resposta terapêutica foram atribuídos a diversos fatores como a presença de biofilmes, a carência de fármacos com efeito bactericida e a presença do gene *erm(41)* (Jarand et al., 2011).

Jeon e col. (2009) estudaram 65 pacientes com doença pulmonar por *M. abscessus* subsp. *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 classificados como sensíveis ou intermediários nos testes de suscetibilidade ao fármaco (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).

1.6 Mecanismos de resistência aos fármacos

O grupo *M. abscessus* é conhecido pela sua resistência intrínseca a maioria dos agentes quimioterápicos, incluindo todos os fármacos utilizados no

tratamento de infecções causadas pelo *M. tuberculosis*. Existem diversos mecanismos naturais de resistência neste grupo, que incluem sua parede celular hidrofóbica e impermeável, sistemas de efluxo, modificação ou inativação de antibióticos através de enzimas e polimorfismos genéticos em genes específicos (Figura 5) (Nessar et al., 2012; Lupeman et al., 2019).



Lopeman et al. Microorganisms. 2019 Mar 22;7(3).

Figura 5. Resumo dos mecanismos de resistência exibidos pelo grupo *Mycobacterium abscessus*. Existem vários mecanismos envolvendo diferentes processos fisiológicos, enzimáticos e genômicos que contribuem para o perfil notoriamente resistente. É provável que estes processos, como bombas de efluxo e genes de resistência a drogas, trabalham em sinergia para produzir patógeno resistente.

O fator que mais contribui para a resistência às diversas classes de antibióticos é a espessa parede celular das micobactérias, que possuem um alto

teor de lipídeos, funcionando como uma barreira para agentes hidrofílicos e lipofílicos, como também para ácidos e álcalis (Daffe et al., 1998; Nguyen & Thompson, 2006).

Além disso, a redução de porinas na parede celular atua sinergicamente com sistemas internos que são ativados pela presença intracelular de antibióticos, ou seja, a redução de porinas acarreta em taxas extremamente baixas de difusão fornecendo aos sistemas reguladores tempo para ativar a expressão de genes de resistência á fármacos (Nguyen & Thompson, 2006).

Outro constituinte da parede celular que também garante a resistência das micobactérias são as bombas de efluxo, que atuam principalmente na proteção contra agentes tóxicos e promove homeostase celular pelo transporte ativo de toxinas ou metabólitos para o ambiente extracelular (De Rossi, et al., 2006; Louw et al., 2009)

O grupo *M. abscessus* codifica proteínas da família de transportadores ABC (ATP-binding cassette), bem como proteínas de membrana da família MmpL (Ripoll et al., 2009). A família de transportadores MmpL é uma subclasse de bombas de resistência a múltiplos fármacos conhecida como permeases de Resistência-Nodulação-Divisão Celular (RNCD), que exportam componentes lipídicos através do envelope celular das micobactérias (Tekaiia et al., 1999). O papel dos MmpLs na resistência aos fármacos no grupo *M. abscessus* ainda não está totalmente compreendido, entretanto, há evidências de que MmpL7 em *M. tuberculosis* confere resistência a isoniazida (Pasca et al., 2005).

1.6.1 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 proteica (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 pelo grupo *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).

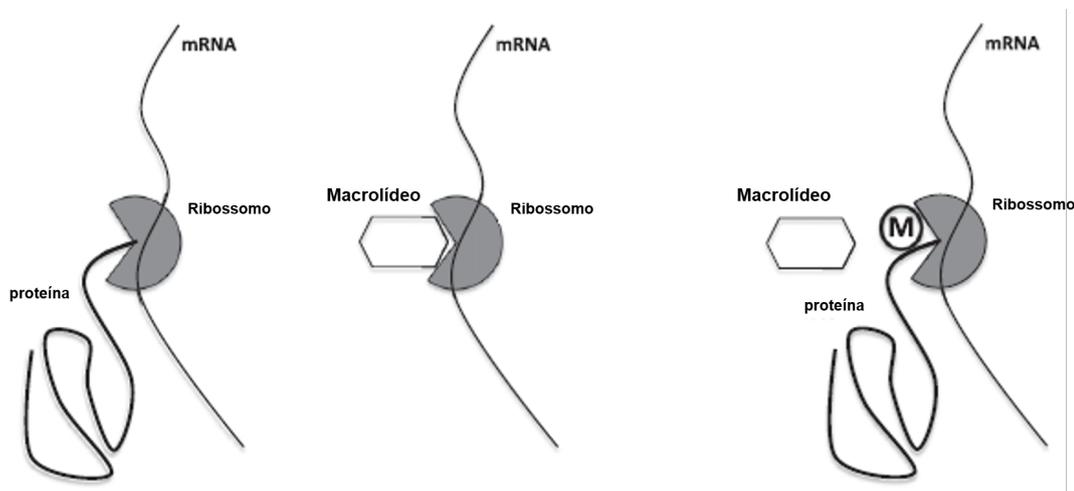
Os mecanismos de resistência a este fármaco podem envolver modificações que alteram a forma e a composição química do sítio de ligação, reduzindo a habilidade dos mesmos em interagir com as unidades ribossomais e inibir a síntese proteica. Estas modificações ocorrem nos genes *rrl* e *erm(41)* (Nash 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* 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, no período de 1990 a 1995, em isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. chelonae* 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 6), 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.

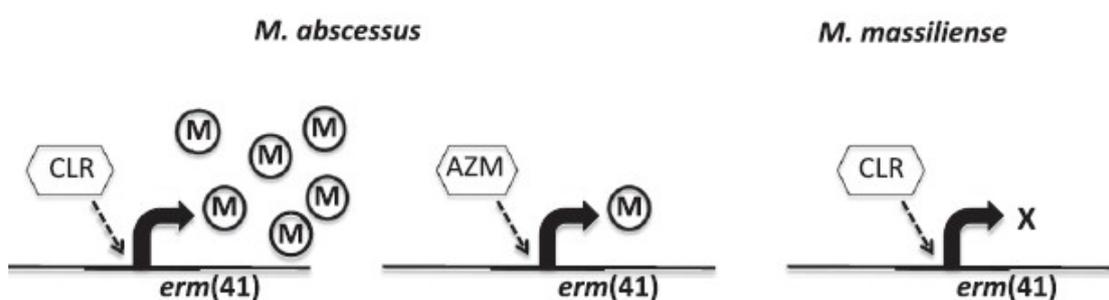
Figura 6. Mecanismo de ação dos macrolídeos e resistência induzida. O macrolídeo se liga ao 23S rRNA, impedindo a síntese proteica. A expressão das

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 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* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *massiliense*. A resistência induzida foi observada em todos os isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e foi significativamente maior após a exposição à claritromicina do que à azitromicina. Em contraste, nenhum isolado de *M. abscessus* subsp. *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* subsp. *abscessus* quando comparados aos produzidos com a azitromicina (Figura 7). Para comprovar a ação direta do gene *erm*(41), foram testados um mutante *M. abscessus* subsp. *abscessus* knock-out e um transformante *M. abscessus* subsp. *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* subsp. *abscessus*, enquanto para as infecções de *M. abscessus* subsp. *massiliense* ambos os macrolídeos foram igualmente efetivos.

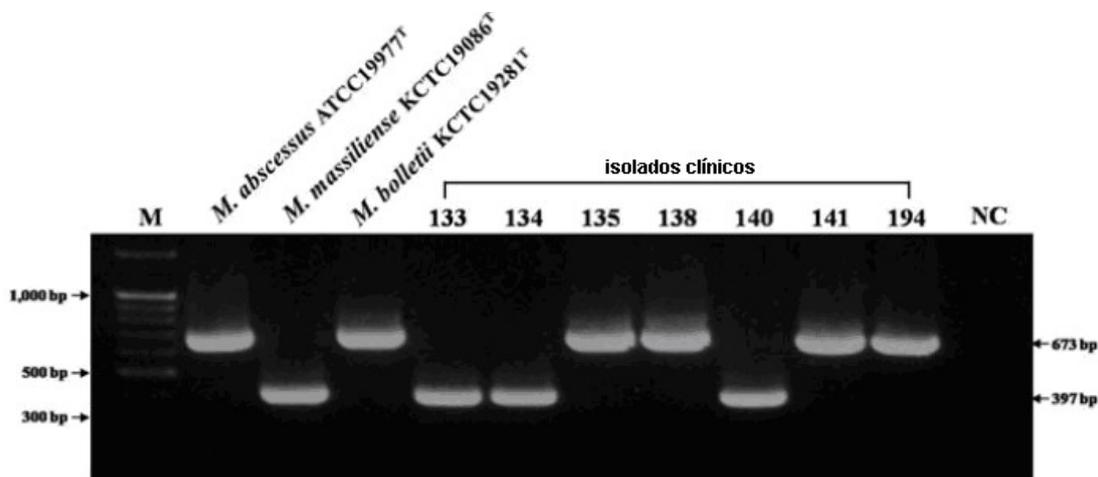


Stout JE Floto RA. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186(9):822-3.

Figura 7. 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* subsp. *abscessus*. Entretanto, nenhum macrolídeo pode promover resistência induzida em *M. abscessus* subsp. *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* subsp. *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* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* fazendo uma correlação com o valor de CIM para claritromicina. Por meio do sequenciamento, os autores observaram que todos os isolados de *M. abscessus* subsp. *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* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *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 uma simples PCR é eficiente para diferenciar *M. abscessus* subsp. *massiliense* das espécies *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*, por meio da visualização da deleção de 274 pb (Figura 8).



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

Figura 8. Produtos de amplificação da PCR do gene *erm(41)* das espécies *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *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* subsp. *abscessus* (135, 138 e 141) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (194) (673pb). Como resultado, *M. abscessus* subsp. *massiliense* pode ser facilmente diferenciado de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *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. abscessus* subsp. *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* subsp. *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. abscessus* subsp. *bolletii* apresentaram a sequência do gene *erm*(41) similar aos isolados de *M. abscessus* subsp. *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, os autores observaram que as sequências do gene *erm*(41) parecem ser espécie específicas, pois as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* apresentaram resistência e as *M. abscessus* subsp. *massiliense* sensibilidade a claritromicina.

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* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* analisando cinco genes, sendo um deles o gene *erm(41)*. Diferentemente dos achados dos trabalhos relatados acima, dos 15 isolados de *M. abscessus* subsp. *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* subsp. *abscessus* ou *M. abscessus* subsp. *bolletii* para estes isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Outro dado que corrobora com esta especulação, é que este gene nestes isolados eram muito semelhantes ao gene *erm(41)* encontrado na cepa padrão *M. abscessus* ATCC19977^T, além de estudos que observaram a ocorrência de transferência horizontal do gene *rpoB* em membros do grupo MAB.

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* subsp. *abscessus* 31 eram sensíveis, 48 resistentes e 120 com resistência induzida. Dos 199 isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, 184 eram sensíveis e 15 resistentes. Dos três isolados de *M. abscessus* subsp. *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. Dentre os isolados resistentes, dois isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e quatro *M. abscessus* subsp. *massiliense* apresentaram mutação pontual no gene *rrl*, com altos valores de CIM (> 64µg/ml).

Carvalho e col. (2018) analisaram 133 isolados do grupo *M. abscessus* em relação ao perfil de suscetibilidade a claritromicina e perfil genômico dos genes *erm(41)* e *rrl*. Após três dias de incubação do teste de suscetibilidade a claritromicina, apenas cinco isolados apresentaram resistência, entretanto, após o período de incubação estendido para 14 dias, 92 isolados apresentaram resistência induzida. Entre os isolados *M. abscessus* subsp. *abscessus* 11% foram sensíveis, 84% apresentaram resistência induzida e 5% resistentes. Dos isolados *M. abscessus* subsp. *bolletii*, 96% apresentaram resistência induzida e 4% resistentes, em contrapartida, 100% dos isolados *M. abscessus* subsp. *massiliense* foram sensíveis a claritromicina. O sequenciamento do gene *rrl* identificou um único isolado com a mutação A2058G, enquanto que deleções no gene *erm(41)* foram detectadas em 30 isolados sensíveis. Dos 103 isolados restantes, 97 eram resistentes ou resistentes induzidos, com perfil selvagem para o gene *erm(41)*, e seis isolados eram sensíveis, apresentando a mutação pontual T28C. Os autores concluíram que a 83,3% dos isolados sensíveis apresentam a deleção no gene *erm(41)* que pode ser fácil e confiavelmente detectada por uma simples reação de PCR.

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 (Carvalho et al., 2018).

Subespécie	Genótipo		Perfil de suscetibilidade a claritromicina ^a
	<i>erm(41)</i>	<i>rrl</i>	
<i>M. abscessus</i>	T28C	WT	S
	WT	WT	RI
	WT	A2058G	R
<i>M. bolletii</i>	T28C	WT	S
	WT	WT	RI
	WT	A2058G	R
<i>M. massiliense</i>	Deleções	WT	S
	Deleções	A2058G	R

a. S: sensível após 14 dias de incubação; R: resistente após três dias de incubação; RI: resistência induzida baseada na prolongação de 3 para 14 dias de incubação.

b. Duas deleções em *erm(41)* de 2bp (nucleotídeos 64-65) e 274pb (nucleotídeos 159-432).

1.6.2 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

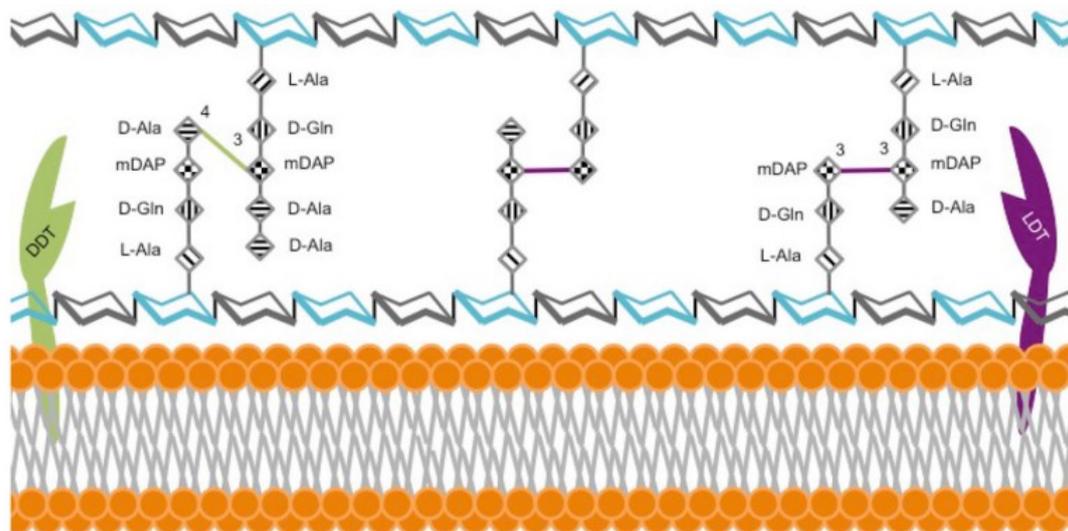
Outro mecanismo enzimático descrito para o grupo *M. abscessus* é a produção endógena da β -lactamases Bla_{Mab} (Soroka et al., 2014). Esta β -lactamase pertence a classe A de Ambler que, juntamente com a baixa permeabilidade da parede celular das micobactérias, contribuem para a resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Outras β -lactamases desta mesma classe já foram descritas em *M. tuberculosis* (Hackbarth et al., 1997), *M. fortuitum* (Galleni et al., 1994) e *M. smegmatis* (Basu et al. 1997). Diferentemente das β -lactamases que são inativadas pelos inibidores clavulanato, tazobactam e sulbactam, a Bla_{Mab} só é inativada por avibactam

(Dubee et al., 2015; Soroka et al., 2017). Estas enzimas são codificadas por genes localizados cromossomicamente e são espécies específicas e presentes em todos os membros da espécie.

Recentemente foi descrita uma β -lactamase Bla_{Mas} na subespécie *M. abscessus* subsp. *massiliense*, que quando comparada com Bla_{Mab} possui comportamento de hidrólise similar, exibindo alta eficiência catalítica em relação a penicilinas e cefalosporina. Além disso, Bla_{Mas} exibiu atividade média aos carbapenêmicos, o que pode sugerir uma possível evolução para ser uma β -lactamase de espectro estendido. Sua estrutura também é similar às β -lactamases encontradas em bactérias Gram negativas, como KPC-2 e SFC-1 (Ramirez et al., 2017).

Os antibióticos das classes de β -lactâmicos são amplamente utilizados no tratamento de diversas infecções bacterianas e são divididos em cinco tipos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e penems (Story-Roller et al., 2018). Sua atividade antimicrobiana é exercida ao inibir a síntese de peptidoglicano, componente essencial da parede celular bacteriana (Hartman et al., 1972).

A etapa final da síntese do peptidoglicano é catalizada por D,D-transpeptidase (DDT), conhecida como proteínas ligadoras de penicilinas. No início de 1974, descobriu-se que a estrutura química do peptidoglicano das micobactérias era diferente dos modelos já estudados e que, portanto, a enzima para sua síntese também seria diferente, denominada L,D-transpeptidase, presente também em *Streptococcus faecalis* (LDT) (Figura 9) (Wietzerbin et al., 1974; Coyette et al., 1974). Estudos posteriores confirmaram que *M. abscessus* utiliza tanto a DDT como a LTD na síntese de peptidoglicano (Mattoo et al., 2017; Kumar et al., 2017a).



Story-Roller et al., Front Microbiol. 2018; 9: 2273.

Figura 9. Modelo do peptidoglicano em *M. abscessus*.

Estudos posteriores demonstraram que as LTDs e DDTs de micobactérias diferem na afinidade com as subclasses de β -lactâmicos e consequentemente são inibidas em diferentes níveis. As DDTs são efetivamente ligadas e inibidas por todas as subclasses de β -lactâmicos, enquanto as LTDs de *M. abscessus* são inibidas pelos carbapenêmicos e em menor extensão pelas cefalosporinas (Kumar et al., 2017b).

Story-Roller e col. (2018) analisaram 35 estudos que testaram β -lactâmicos para *M. abscessus* e observaram uma variabilidade no perfil de suscetibilidade, sugerindo possível relação com a falta de padronização de tratamento. O imipenem e cefoxitina foram os β -lactâmicos mais utilizados e todos os estudos apresentaram isolados resistentes. Apenas em quatro estudos todos os isolados foram sensíveis ou resistentes intermediários a cefoxitina, e dois estudos observaram que isolados da subespécie *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* foram sensíveis ou resistentes intermediários ao imipenem, enquanto isolados da subespécie *M. abscessus*

subsp. *abscessus* exibiram CIMs elevados a este fármaco. Os autores concluem que novas investigações devem ser feitas para esta classe de antibiótico e que a utilização de duas sub-classes de β -lactâmicos podem ter melhor eficácia, já que atuam em diferentes aspectos da parede celular das micobactérias.

1.6.3 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos caracterizados por um amplo espectro antimicrobiano, rápida ação bactericida e capacidade de agir sinergicamente com outros fármacos (Chen et al., 2009). Grande parte dos aminoglicosídeos são substâncias naturais produzidas por actinomicetos dos gêneros *Streptomyces* ou *Micromonospora*. A atividade bactericida dos aminoglicosídeos está relacionada com a inibição da síntese de proteínas, na qual estes antibióticos ligam-se à subunidade ribossômica 30S bacteriana, diminuindo a fidelidade no processo de tradução, resultando em morte celular (Prammananan et al., 1998; Kotra et al., 2000).

A amicacina é o aminoglicosídeo mais utilizado no tratamento das MNTs, incluindo *M. abscessus* e é considerado um dos antibióticos parenterais mais ativos para o tratamento de infecções por este grupo. A resistência aos aminoglicosídeos é conferida por uma mutação pontual no 16S rRNA (gene *rrs*) na posição 1408 (A1408G), que confere alto nível de resistência a amicacina, canamicina e gentamicina (Prammananan et al., 1998). Outros mecanismos de resistência à amicacina foram relatados como modificação do fármaco, redução na permeabilidade e/ou aumento do efluxo.

Mutações no gene *rrs* e na proteína ribossômica S12 (RpsL) são responsáveis pela resistência de alto nível à amicacina em *M. abscessus*. Nos últimos anos, a superexpressão do gene da enzima modificadora de aminoglicosídeos (*eis2*) e do gene transportador *tap* também foram

demonstrados estar envolvidos na resistência a amicacina. A ativação constitutiva desses genes é frequentemente causada pela expressão aumentada do gene ativador *whiB7* (Pryjma et al., 2017; Hurst-Hess et al., 2017).

Relativamente, poucos estudos se concentraram na avaliação da resistência à amicacina no grupo *M. abscessus* e sua relevância para o manejo clínico. Um estudo retrospectivo avaliou a utilização de amicacina inalatória no tratamento de doença pulmonar de 77 pacientes com isolados pertencentes ao complexo *M. avium* (N=20) resistente, ao grupo *M. abscessus* (N=48) e com infecção mista (N=9). Destes pacientes, apenas cinco (6%) apresentaram resistência a amicacina, sendo dois pacientes com infecção por *M. abscessus* subsp. *abscessus* e um paciente com *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Os autores não observaram o desenvolvimento de resistência em pacientes com *M. abscessus* subsp. *abscessus* durante 12 meses de seguimento (Jhun et al., 2018).

Zheng e col (2018) avaliaram o perfil de suscetibilidade a diversos fármacos de isolados do grupo *M. abscessus* e o perfil genético envolvido na resistência dos mesmos. Dos 381 isolados avaliados, apenas 13 (3,4%) apresentaram resistência a amicacina, sendo que destes isolados nove apresentaram a mutação A1408G no gene *rrs*. Foi também observado que os isolados resistentes a amicacina apresentaram altos valores de CIM ($\geq 8\mu\text{g/ml}$) para tobramicina, sugerindo que o gene *rrs* conferiu uma resistência cruzada a este fármaco.

Wu e col. (2019) avaliaram a suscetibilidade a amicacina de 194 isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e caracterizaram molecularmente os isolados resistentes por meio de sequenciamento genômico total e pela técnica de qRT-PCR. Os autores observaram que a amicacina apresentou uma alta atividade bactericida, com CIM₅₀ de 8 mg/L e CIM₉₀ de 16 mg/L. Cinco isolados (2,6%) foram resistentes a amicacina, com altos valores de CIM (>1024 mg/L). Destes cinco isolados resistentes, quatro (80%) apresentaram

resistência associada à mutação A1408G no gene *rrs* e a análise do qRT-PCR mostrou uma superexpressão do gene regulador transcricional *whiB7* e do gene transportador de efluxo *tap*. Entretanto, a superexpressão do gene *eis2*, codificador da enzima modificadora de aminoglicosídeo, foi observada somente em um isolado resistente.

1.7 Teste de suscetibilidade aos fármacos

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, 2018). Recomenda-se que sejam testados os seguintes antimicrobianos: amicacina, ciprofloxacina, ceftoxitina, claritromicina, doxiciclina (ou minociclina), imipenem, linezolida, moxifloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol e tobramicina. Esse 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, 2018). No entanto, esses 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 tolerabilidade do mesmo a antibioticoterapia empregada (Heginbothom, 2001; Brown-Elliott et al., 2012).

Existe grande variabilidade no perfil de resistência aos fármacos e recomenda-se a realização do teste de suscetibilidade para que seja escolhida a melhor estratégia terapêutica. O CIM é o teste padrão recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Atualmente, o único teste comercial disponível para MCR é o Sensititre Rapid Growing Mycobacteria Plate Format (Trek Diagnostic Systems), uma

placa pronta contendo os fármacos liofilizados nas concentrações padronizadas. No entanto, o teste apresenta um custo de comercialização elevado, o que pode restringir sua utilização, principalmente em laboratórios públicos. Sendo assim, os testes são realizados *in house*, utilizando-se placas de 96 orifícios para testar diferentes concentrações de fármaco, proporcionando um grande trabalho no preparo, inoculação, leitura e controle de qualidade dos testes. Em cada etapa desse processo podem ocorrer erros, os quais podem ser inúmeros uma vez que o processo envolve muitas etapas de diluições, desde o preparo dos fármacos até a finalização da placa.

O sistema automatizado BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, USA - BD), considerado de referência para detectar a resistência em *M. tuberculosis* aos fármacos tanto de primeira como de segunda linha, possui as vantagens de ser completamente automatizado e mais rápido, por utilizar meio de cultura líquido. A implementação desta metodologia no Brasil foi realizada após a padronização e validação para os fármacos de primeira linha por pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e da Rede de Pesquisa em Tuberculose, em parceria com a empresa BD (Giampaglia et al., 2007a; Giampaglia et al., 2007b).

Posteriormente, em 2012, o teste de suscetibilidade pelo BACTEC MGIT 960 aos fármacos de segunda linha utilizados no tratamento da TB-MR foi também padronizado e validado pela equipe do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do IAL e implantado na rotina diagnóstica, sendo que os resultados do teste são utilizados pelo Programa de Controle da TB do estado para a adequação do esquema de tratamento dos pacientes (Gallo et al., 2017).

Com o desenvolvimento do software TB eXiST, a amplitude de protocolos que podem ser realizados no sistema aumentou, possibilitando seu uso para organismos com tempos de crescimento diferentes do *M. tuberculosis*. De acordo com o CLSI, a determinação do perfil de suscetibilidade aos fármacos é método e espécie dependente. A padronização do teste no sistema BACTEC MGIT 960 para algumas espécies de micobactérias de crescimento

lento foi desenvolvido (Lucke et al., 2012), no entanto, não existe padronização do teste para MCR.

Anualmente são identificados no Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do IAL, em média, 80 isolados de *M. abscessus*, dos quais 75% são casos e necessitam da realização do teste de suscetibilidade para que seja delineado o tratamento correto. Esses casos causam impacto no programa de controle da tuberculose, pois a maioria é notificada e tratada como tuberculose e somente após meses de tratamento (ou até anos) existe a mudança de diagnóstico.

Assim, este estudo forneceu informações importantes para o desenvolvimento de um novo teste de suscetibilidade para MCR através de uma metodologia que é referência mundial.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo e determinar as concentrações críticas para os fármacos amicacina, claritromicina, cefoxitina e imipinem utilizados no tratamento de doença por *M. abscessus* para o teste de suscetibilidade no sistema MGIT 960/TB eXiST e avaliar possíveis interferentes fenotípicos e moleculares.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a diluição do inóculo para o teste de suscetibilidade para *M. abscessus* no sistema BACTEC MGIT960/TB eXiST;
2. Determinar a concentração inibitória mínima dos fármacos amicacina, cefoxitina e imipenem de isolados clínicos;
3. Determinar a concentração crítica dos fármacos claritromicina, amicacina, cefoxitina e imipenem para o sistema BACTEC MGIT/960 TB eXiST;
4. Avaliar a sensibilidade e especificidade do BACTEC MGIT/960 TB eXiST como teste de suscetibilidade utilizando como padrão ouro o CIM recomendado pelo CLSI;
5. Avaliar possíveis interferentes genéticos no perfil de suscetibilidade a claritromicina devido à presença de genes de resistência em plasmídeos.

3. Material e Métodos

3.1 Comitê de Ética em Pesquisa

Este trabalho teve aprovação do Comitê de Ética sob o número 923.823 e está disposto no Anexo I.

3.2 Isolados

Foram selecionados 31 isolados clínicos identificados como pertencentes ao grupo *M. abscessus*, cujos perfil de suscetibilidade a claritromicina e mutações relacionadas aos genes *rrl* e *erm(41)* haviam sido caracterizados previamente no estudo de Carvalho e col., 2018 (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil genético dos genes *erm(41)* e *rrl* genes descritos no grupo *M. abscessus* e resultados do CIM após 14 dias de incubação dos 32 isolados selecionados.

Genótipo		Suscetibilidade a claritromicina ^a			Espécies do MAG		
<i>rrl</i>	<i>erm(41)</i>	S (N=14)	RI (N=14)	R (N=3)	<i>M. a. abscessus</i> (N=14)	<i>M. a. bolletii</i> (N=9)	<i>M. a. massiliense</i> (N=8)
WT	WT	–	14	2	7	9	–
A2058G	WT	–	–	1	1	–	–
WT	Deleções ^b	11	–	–	3	–	8
WT	T28C	3	–	–	3	–	–
A2058G	T28C	–	–	–	–	–	–

a. S: sensível após 14 dias de incubação; R: resistente após 3 dias de incubação; RI: resistência induzida baseada na prolongação de 3 para 14 dias de incubação.

b. Duas deleções em *erm(41)* de 2bp (nucleotídeos 64-65) e 274bp (nucleotídeos 159-432).

MAG: grupo *M. abscessus*

Estes isolados foram selecionados de acordo com a subespécie identificada e perfil de suscetibilidade a claritromicina, para serem testados no protocolo a ser desenvolvido no sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST.

3.3 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 ±20 miçangas de vidro estéreis. 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 $36^{\circ}\text{C}\pm 1$.

3.4 Teste de suscetibilidade aos fármacos pelo método de concentração inibitória mínima com resazurina (REMA)

Os testes de suscetibilidade aos fármacos amicacina, cefoxitina e imipenem foram realizados no Laboratório do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do IAL. O protocolo do teste de suscetibilidade foi baseado nas recomendações do CLSI (2018). O teste foi feito em microplacas usando caldo MHC. As cepas padrões *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *M. abscessus* ATCC 19977 foram utilizadas para o controle de qualidade dos testes de CIM. As placas foram preparadas *in house*, e após o preparo, as mesmas foram congeladas a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1$ po até um mês. A configuração das placas foi desenhada para testar dois isolados por placa, e para cada amostra foram feitos dois poços de controle de crescimento sem fármaco (CC) e dois poços de controle do meio (CM), sem fármaco e sem inóculo.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AK	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	CC	CC	CM	CM
B	CEF	512	256	128	64	32	16	8	4	CC	CC	CM	CM
C	IMI	128	64	32	16	8	4	2	1	CC	CC	CM	CM
D													
E	AK	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	CC	CC	CM	CM
F	CEF	512	256	128	64	32	16	8	4	CC	CC	CM	CM
G	IMI	128	64	32	16	8	4	2	1	CC	CC	CM	CM
H													

Figura 10. Esquema representativo da organização das placas de CIM e as concentrações finais de amicacina (AK), cefoxitina (CEF) e imipenem (IMI) em cada orifício em µg/ml. CC= controle de crescimento (controle positivo); CM= controle de esterilidade (controle negativo).

A preparação do inóculo, diluições e inoculação foram realizadas como descrito no CLSI (2018), entretanto para as leituras das placas foi utilizado o corante indicador de crescimento, resazurina, como descrito em Carvalho e col. (2018). Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento mínimo de 90% das células. Os critérios de suscetibilidade foram definidos de acordo com o CLSI (2018) (Tabela 3).

Tabela 3. Definição de suscetibilidade aos fármacos dos isolados do estudo, de acordo com as concentrações pontes de corte estabelecidas pelo CLSI (2018).

Fármaco	Sensível	Intermediário	Resistente
Clarithromicina	≤2µg/ml	4µg/ml	≥8µg/ml
Amicacina	≤16µg/ml	32µg/ml	≥64µg/ml
Cefoxitina	≤16µg/ml	32µg/ml - 64µg/ml	≥128µg/ml
Imipenem	≤4µg/ml	8µg/ml - 16µg/ml	≥32µg/ml

3.5 Protocolo de teste de suscetibilidade aos fármacos pelo MGIT 960/TB eXiST

3.5.1 Padronização de inóculo para teste de suscetibilidade MGIT 960/TB eXiST

A literatura não apresenta relatos sobre a utilização do sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST em micobactérias de crescimento rápido. Uma vez que não existe padronização, um protocolo foi elaborado para determinar o inóculo a ser utilizado. Esse protocolo inicial foi elaborado com base no protocolo do fabricante utilizado para crescimento de *M. tuberculosis* no referido sistema. Para que o software TB eXiST faça a leitura dentro do protocolo estabelecido para o equipamento, o isolado precisa crescer a partir de 72 horas (3 dias) de incubação.

A cepa de *M. abscessus* ATCC 19977 crescida em LJ foi utilizada para a padronização. Realizou-se o repique em meio MHC e, após três dias de incubação, uma suspensão bacteriana em água destilada estéril comparável à escala 0,5 de McFarland foi preparada. Esta suspensão foi diluída nas seguintes proporções: 1:10, 1:25, 1:100, 1:150, 1:200 (Tabela 4). O volume de 500µl de suspensão foi adicionado em um tubo MGIT suplementado com 800µl de enriquecimento OADC. Os tubos foram incubados no equipamento BACTEC MGIT 960 de acordo com o procedimento do fabricante, utilizando o software TB eXiST.

Para todas as diluições testadas foi observado crescimento após 24 horas de incubação. Em seguida, um novo teste foi realizado com diluições a 2×10^{-4} , 10^{-4} , 2×10^{-5} e 10^{-8} a partir do inóculo padronizado para a escala 0,5 de McFarland. Para as duas primeiras diluições o crescimento bacteriano foi detectado após 24 horas de incubação, enquanto para as diluições seguintes o crescimento foi detectado com 48 e 72 horas de incubação, respectivamente.

A suplementação do meio foi avaliada com a utilização de dois tubos MGIT, um com 400µl do enriquecimento OADC e outro sem adição do enriquecimento. O teste foi realizado com a suspensão diluída a 10^{-4} , em todos com e sem enriquecimento e o crescimento bacteriano foi detectado com 48 e 72 horas de incubação, respectivamente. A partir destes resultados, observou-se que a suplementação com o enriquecimento OADC estaria permitindo um crescimento bacteriano acelerado, tornando o seu uso desnecessário devido ao tempo de crescimento do microrganismo selecionado para este estudo.

Tabela 4. Diluições testadas para padronização do inóculo a ser utilizado no sistema BACTEC MGIT/TB eXiST e tempo de detecção para atingir 100 unidades de crescimento (UC).

Diluições	Tempo de detecção de crescimento (UC)
1:10	24 horas
1: 25	24 horas
1:100	24 horas
1:150	24 horas
1:200	24 horas
1:5000	24 horas
1:10000	24 horas
1:10000*	48 horas
1:10000**	72 horas
1:50000	48 horas
1:100000000	72 horas

*400µl de OADC; ** sem OADC

Com estes resultados, um terceiro teste foi realizado no qual a suspensão diluída a 10^{-4} foi adicionada a um tubo MGIT sem suplementação (controle) e a quatro tubos MGIT sem suplementação contendo claritromicina

nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, e 8,0 µg/ml. No tubo controle o crescimento bacteriano foi detectado após 72 horas e nos tubos contendo o fármaco o crescimento foi detectado após 72, 96, 168 e 312 horas (Figura 11).

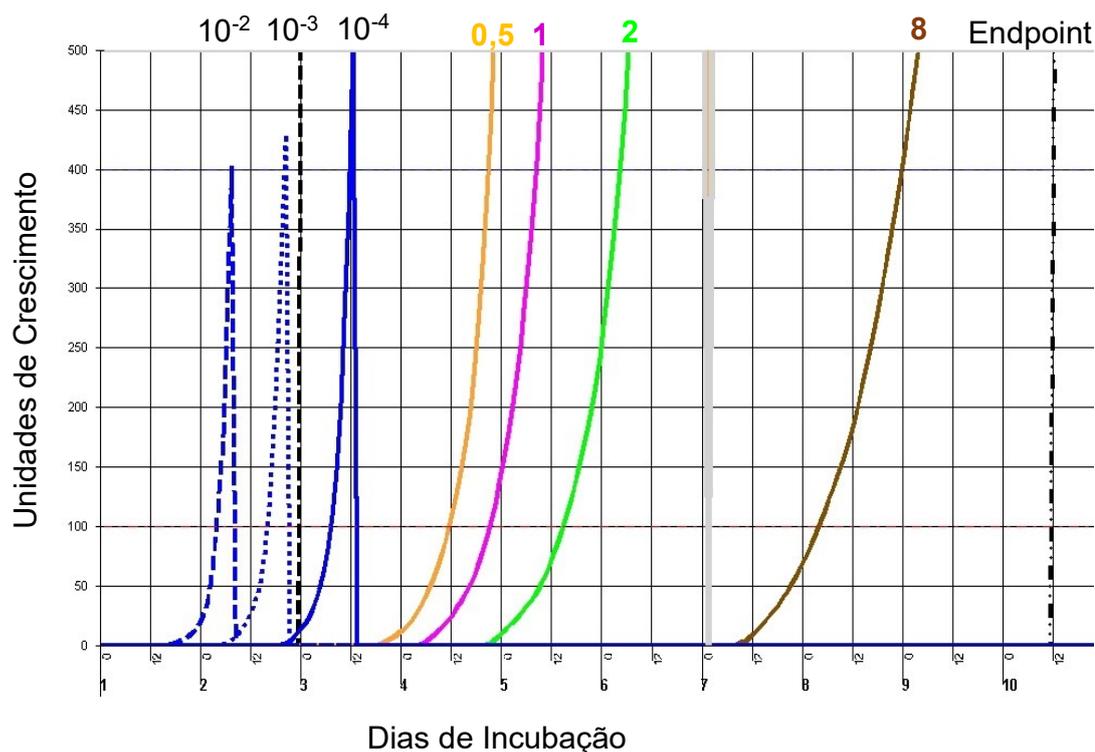


Figura 11. Curva de crescimento da cepa *M. abscessus* ATCC 19977^T no sistema MGIT 960/TB eXiST. Os tubos controles (sem fármaco) foram inoculados com as diluições a 10^{-2} (azul tracejado), 10^{-3} (azul pontilhado) e 10^{-4} (azul sólido). Linhas coloridas correspondem a curvas de crescimento em diferentes concentrações de claritromicina (linha laranja: 0,5 µg/ml; linha rosa: 1 µg/ml; linha verde: 2 µg/ml; linha marrom: 8 µg/ml).

O software TB eXiST produz um gráfico no qual o eixo vertical mostra valores de Unidade de Crescimento (UC) e no eixo horizontal o número de dias de incubação do teste. A linha azul corresponde à curva de crescimento do tubo

MGIT Controle de Crescimento (CC), que precisa atingir em unidades de crescimento (UC) = 400 no tempo mínimo de 72 horas. As linhas coloridas correspondem à curva de crescimento em tubo MGIT contendo as diferentes concentrações do fármaco. A linha laranja corresponde ao tubo com a concentração de 0,5 µg/ml, a linha rosa ao tubo com concentração de 1 µg/ml, a linha verde ao tubo com concentração de 2 µg/ml e a linha marrom ao tubo com concentração de 8 µg/ml.

A linha preta tracejada ajuda com a interpretação da concentração antimicrobiana, ou seja, é traçada no ponto de tempo que corresponde a N dias após a primeira linha do CC atingir UC=400. O valor de "N" corresponde a sete dias, que é determinado pelo software do TB eXisT. Assim, se as linhas coloridas que correspondem às curvas de crescimento dos tubos contendo as diversas concentrações do fármaco apresentarem UC=100 antes da curva de crescimento do CC atingir UC=400, o resultado do teste é resistente. Caso atinjam UC=100 entre a curva do CC e a linha preta tracejada, serão considerados como resistentes intermediários. As linhas que apresentarem UC=100 após a linha tracejada preta serão considerados resultados sensíveis.

A partir destes resultados, foram testados três isolados com suscetibilidade a claritromicina conhecida pelo método REMA, sendo o isolado 2566 sensível (Figura 12), a cepa ATCC 19977 com resistência induzida (figura 11) e o isolado 1656 resistente (Figura 13). No tubo MGIT controle foi adicionada a suspensão diluída 10^{-4} e nos tubos MGIT contendo o fármaco, nas diferentes concentrações citadas acima, foram testadas as suspensões diluídas a 10^{-2} e 10^{-3} sem suplementação em todos os tubos.

Os tubos controles apresentaram crescimento após 72 horas de incubação e apenas a diluição 10^{-2} proporcionou consistentemente os perfis de susceptibilidade esperados para todos os três fenótipos de claritromicina e foi posteriormente confirmado como satisfatório para os outros fármacos.

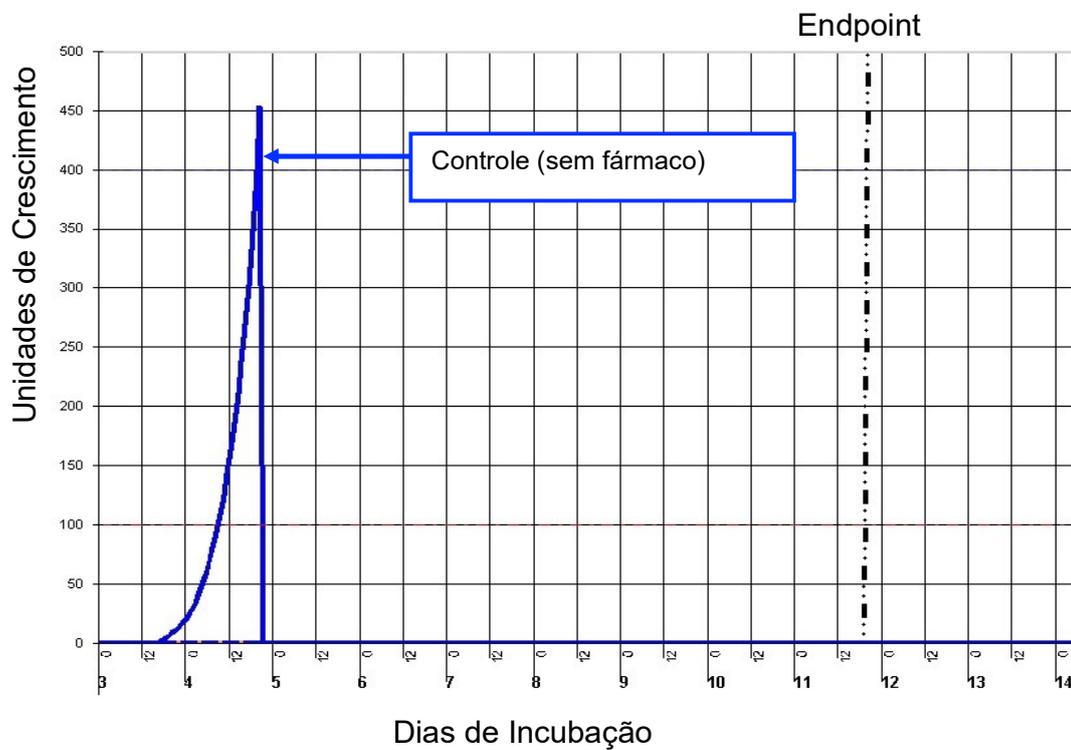


Figura 12. Curva de crescimento do isolado #2566 *M. abscessus* subsp. *massiliense* no sistema MGIT 960/TB eXiST, incluindo o tubo controle (sem fármaco) e aqueles com claritromicina a 0,5, 1, 2, e 8 µg/mL.

Para o isolado sensível não foi detectado crescimento nos tubos contendo claritromicina, enquanto para o isolado resistente, em todos os tubos contendo claritromicina, independente da concentração, houve detecção de crescimento antes do tubo controle.

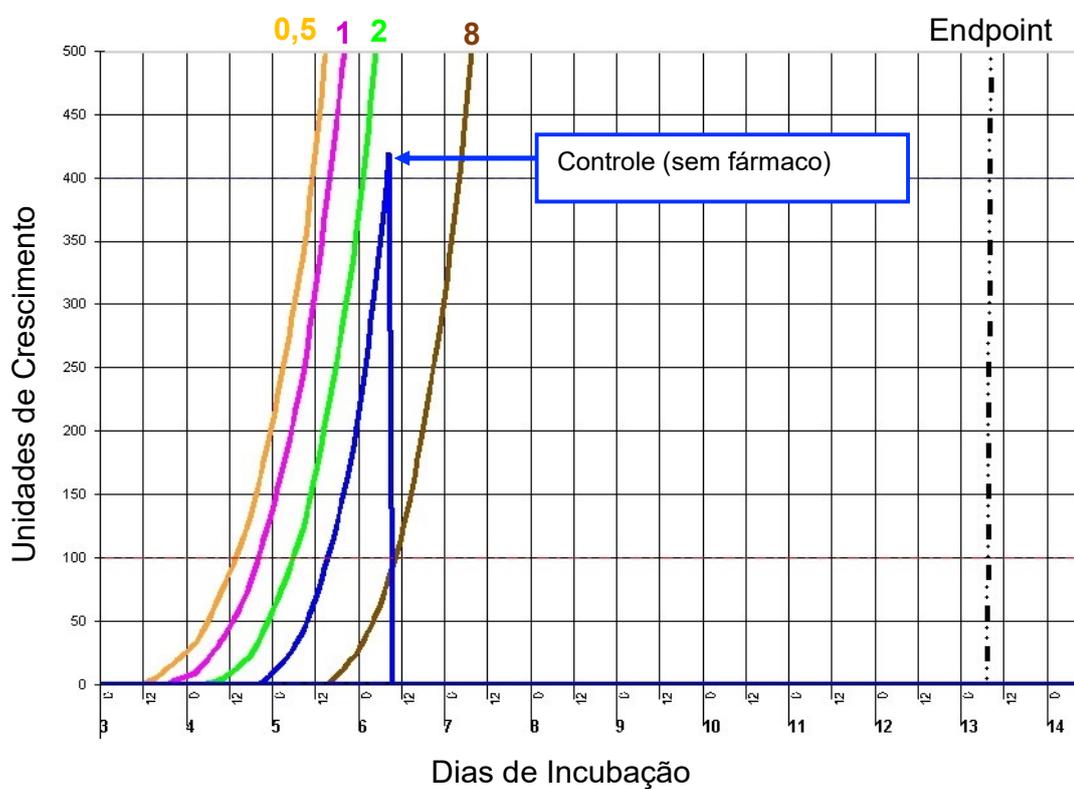


Figure 13. Curva de crescimento do isolado #1656 *M. abscessus* subsp. *abscessus* no sistema MGIT 960/TB eXiST, incluindo o tubo controle (sem fármaco) e aqueles com claritromicina a 0,5 (linha laranja), 1 (linha rosa), 2 (linha verde), e 8 µg/mL (linha marrom).

3.5.2 Preparo das soluções de fármacos para teste de suscetibilidade MGIT 960/TB eXiST

As cepas foram testadas contra os fármacos claritromicina, amicacina, cefoxitina e imipenem. A solução mãe do fármaco foi diluída no diluente

apropriado a cada fármaco, considerando a potência informada pelo fabricante, aliquotada em criotubos e armazenada a $-20^{\circ}\text{C}\pm 2$.

3.5.3 Preparação do teste de suscetibilidade aos fármacos pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST

Cada isolado foi testado em oito diferentes concentrações de cada fármaco. Estas concentrações foram baseadas nos critérios de suscetibilidade recomendados pelo CLSI (2018) (Tabela 5). Nos tubos MGIT foram adicionados 0,1 ml de cada concentração de fármacos e foram inoculados com 0,5 ml da suspensão de trabalho, previamente padronizada. Para o controle positivo de cada teste foi adicionado somente 0,5 ml de inóculo de cada isolado.

Tabela 5. Concentrações dos fármacos utilizados no teste de suscetibilidade pelo sistema MGIT 960.

Fármaco	Concentrações baseadas no CLSI (2018) em $\mu\text{g/ml}$
Amicacina	16, 32, 64, 128
Claritromicina	0,5, 1, 2, 8
Cefoxitina	16, 32, 64, 128
Imipenem	4, 8, 16, 32

3.5.4 Análise comparativa entre os métodos REMA e MGIT 960/TB eXiST

A análise comparativa entre o método REMA e sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST foi feita com base no documento M23-A4 do CSLI (2018). Os resultados obtidos por ambos os métodos foram classificados da seguinte forma: concordante, o mesmo resultado foi obtido pelos dois métodos; erro leve,

um resultado intermediário por um método e um resultado suscetível ou resistente pelo outro método; erro grave, o BACTEC MGIT 960 relatou incorretamente um isolado suscetível como resistente; ou muito grave, o BACTEC MGIT 960 relatou incorretamente que um isolado resistente era suscetível.

3.6 Análise de interferência de genes plasmidiais na resistência de *M. abscessus*

3.6.1 Detecção da presença de plasmídeos nos isolados analisados

A presença de plasmídeos não integrados nos cromossomos dos isolados analisados no estudo foi verificada utilizando a técnica Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) de acordo com Viana-Niero e col. (2008), a qual foi realizada no laboratório da Profa. Dra. Sylvia Cardoso Leão da Universidade Federal de São Paulo. Colônias isoladas foram subcultivadas em meio Muller-Hinton suplementado com Tween 80 a 37°C até atingir uma densidade ótica de 0,64 a 650 nm. Plugs de agarose contendo células bacterianas foram preparados em low-melt preparative grade agarose. O DNA foi isolado nos plugs, que foram aplicados em géis de PFGE. A eletroforese foi realizada em equipamento CHEF-DR III System (Bio-Rad) a 14°C por 21 h a 6V/cm, com alternância de 1,6 a 21,3 s. Lambda Ladder PFGE Marker (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) foi usado como marcador molecular.

3.6.2 Sequenciamento de genoma completo

No projeto inicial foi proposto avaliar os interferentes moleculares encontrados em plasmídeos pelo sequenciamento de alguns genes de

resistência conhecidos. No entanto, os plasmídeos detectados excediam o tamanho (>150 kb) que kits de extração que estão atualmente no mercado são capazes de extrair e purificar. Para que uma análise de interferentes genéticos pudesse ser feita, foi necessário sequenciar o genoma dos isolados e fazer a separação do plasmídeo via análise computacional.

O Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do IAL realizou uma parceria com o Instituto de Medicina Tropical (IMT), com o qual já desenvolveu outra pesquisa anterior (Projeto FAPESP n. 2010/19122-0). O IMT possui equipamento de sequenciamento de nova geração (Íon Torrent) no laboratório da Dra. Ester Sabino, em colaboração com a Dra. Silvia Costa, e disponibilizou sua utilização para as análises.

A técnica de extração do DNA das amostras foi realizada de acordo com Brown et al. (2015) com algumas modificações. As culturas de micobactérias crescidas no meio Lowenstein-Jensen, foram aquecidas a 80° por 50 minutos para inativação. Após esse processo duas alçadas de cada cultura, foram suspensas em tubos de 2ml contendo aproximadamente 250 µL de beads de vidro e 300 µL do tampão TE (Tris-EDTA), o qual foi mantido a 4°C. Após resfriamento os tubos foram agitados por 3 minutos e centrifugados por 5 minutos a 16.000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2 ml para subsequente extração de DNA utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções dos fabricantes. Após a extração o DNA foi quantificado utilizando o Qubit® dsDNA BR Assay Kits (life technologies), e submetido ao sequenciamento utilizando a plataforma Ion Proton.

Os dados gerados foram analisados pela equipe do pesquisador Dr. João Carlos Setubal, Professor do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo, que possui larga experiência na montagem e anotação de genomas de microrganismos.

Após este processo, foi realizada uma curadoria manual utilizando o banco de dados do BLAST e do UNIPROT. Para verificação da presença de genes de resistência aos antimicrobianos foi utilizada a ferramenta on-line

ResFinder (Zankari et al., 2012), e para verificação de compatibilidade com plasmídeos descritos utilizou-se a ferramenta PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014). A verificação de regiões contendo elementos móveis foi feita através da ferramenta ISFinder. Para análise da possível função das proteínas hipotéticas, utilizou-se o banco de dados do Protein BLAST e do InterPro.

3.7 Categorização dos isolados segundo tratamento dos pacientes

A categorização dos isolados teve como objetivo estabelecer a suscetibilidade de cada fármaco baseada na história de tratamento do paciente. Os isolados são categorizados como prováveis sensíveis, se provenientes de pacientes que nunca foram tratados com os fármacos em estudo, e prováveis resistentes, se foram tratados com algum dos fármacos por mais de seis meses (Koh et al., 2017). As informações sobre tratamento foram obtidas no Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, através do banco de notificação de casos de tuberculose TBWEB (<http://www.cvetb.saude.sp.gov.br/tbweb/>), e a busca pelo esquema de tratamento foi realizada pelo Dr. Sidney Bombarda.

4. Resultados

4.1 Teste de suscetibilidade aos fármacos pelo método de concentração inibitória mínima com resazurina (REMA)

A cepa controle *M. abscessus* ATCC 19977 demonstrou resistência induzida à claritromicina, resistência intermediária à cefoxitina, suscetibilidade a amicacina e resistência ao imipenem. Entre os 31 isolados clínicos, a distribuição dos resultados de suscetibilidade pelo método REMA diferiu entre

os fármacos avaliados e as espécies dos isolados (Tabela 6). Para claritromicina, 45% dos isolados testados foram sensíveis, dos quais 100% eram *M. abscessus* subsp. *massiliense*; 45% apresentaram resistência induzida e 10% foram resistentes. Em contraste, 100% dos isolados foram sensíveis a amicacina e resistentes ao imipenem. Para a cefoxitina, 90,5% dos isolados apresentaram sensibilidade intermediária.

Tabela 6. Perfil de suscetibilidade aos fármacos dos isolados pelo método REMA de acordo com a identificação de espécie.

Fármacos	Espécie		
	<i>M. a. abscessus</i> N= 14	<i>M. a. bolletii</i> N= 9	<i>M. a. massiliense</i> N= 8
Claritomicina			
S	6 (43%)	0 (0%)	8 (100%)
RI	6 (43%)	8 (89%)	0 (0%)
R	2 (14%)	1 (11%)	0 (0%)
Cefoxitina			
S	1 (7%)	0 (0%)	1 (13%)
I	12 (86%)	8 (89%)	7 (87%)
R	1 (7%)	1 (11%)	0 (0%)
Imipenem			
S	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
R	14 (100%)	9 (100%)	8 (100%)
Amicacina			
S	13 (93%)	9 (100%)	8 (0%)
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

R	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)
---	--------	--------	--------

S: sensível, I: intermediário, RI: Resistência induzida, R: resistente.

4.2 Teste de suscetibilidade aos fármacos pelo método BACTEC MGIT 960/TB eXiST

A partir dos diversos testes para padronizar o inóculo do protocolo, foi determinado a diluição de 10^{-4} para o tubo controle, sem adição de enriquecimento (OADC), e de 10^{-2} para os tubos contendo as diversas concentrações dos fármacos. Os resultados de suscetibilidade para os fármacos testados estão dispostos na Tabela a seguir.

Tabela 7. Resultados obtidos pelo método BACTEC MGIT 960/EpiCenter TB eXiST após 15 dias de incubação, de acordo com a espécie identificada.

Fármacos	Espécie		
	<i>M. a. abscessus</i> N= 14	<i>M. a. bolletii</i> N=9	<i>M. a. massiliense</i> N=8
Claritomicina			
S	6 (43%)	0 (0%)	8 (100%)
RI	5 (36%)	2 (22%)	0 (0%)
R	3 (21%)	7 (78%)	0 (0%)
Cefoxitina			
S	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)
I	9 (64%)	4 (45%)	3 (37%)
R	4 (28%)	5 (55%)	5 (63%)
Imipenem			
S	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
I	2 (14%)	3 (33%)	0 (0%)

R	12 (86%)	6 (67%)	8 (100%)
Amicacina			
S	13 (93%)	9 (100%)	8 (100%)
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
R	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)

S: sensível, I: intermediário, R: resistente.

4.3 Análise comparativa entre os métodos REMA e BACTEC MGIT 960/TB eXiST

A comparação dos resultados obtidos por ambos os métodos de teste de suscetibilidade aos fármacos está disposta na Tabela 5. Para amicacina, houve 100% de concordância com 30 isolados sensíveis e um resistente em ambos os protocolos. Para imipenem, 26 (84%) isolados foram resistentes por ambos os métodos. Os cinco (16%) isolados restantes foram considerados resistentes pelo método REMA, mas apresentaram resistência intermediária pelo MGIT 960 e, portanto, representam erros leves. Para cefoxitina, ambos os protocolos apresentaram o mesmo resultado para 18 (58%) isolados, que incluíram uma cepa sensível, duas resistentes e 15 resistentes intermediárias. Todas as discrepâncias foram consideradas erros menores, incluindo 12 (39%) isolados que apresentaram resistência intermediária pelo método padrão ouro (REMA), mas apresentaram resistência pelo sistema MGIT 960/TB eXiST. O isolado restante foi sensível por REMA, mas resistente intermediário pelo sistema MGIT 960/TB eXiST.

Tabela 8. Comparação dos perfis de suscetibilidade dos fármacos claritromicina, amicacina, cefoxitina e imipenem obtidos pelos métodos REMA e BACTEC MGIT 960/TB eXiST nas concentrações de ponto de corte.

Fármaco	MGIT	REMA			TOTAL
AK		S	I	R	
	S	30	–	–	30 (97%)
	I	–	–	–	-
	R	–	–	1	1 (3%)
IMP		S	I	R	
	S	–	–	–	-
	I	–	–	5	5 (16%)
	R	–	–	26	26 (84%)
FOX		S	I	R	
	S	1	–	–	1 (3%)
	I	1	15	–	16 (52%)
	R	–	12	2	14 (45%)
CLR		S	RI	R	
	S	14	–	–	14 (45%)
	I	–	6	1	7 (23%)
	R	–	8	2	10 (32%)

Fármacos: CLR, claritromicina; FOX, cefoxitina; IMP, imipenem; AK, amicacina. Suscetibilidade: S, sensível; RI, resistência induzida; I, intermediário; R, resistente.

A comparação dos dois métodos para a claritromicina foi mais criteriosa devido a ocorrência do mecanismo de resistência induzida, que só pode ser identificado pela extensão do tempo de incubação do método REMA de três para 14 dias. Devido ao tipo de detecção de cada método, não é possível estabelecer uma correlação temporal para a avaliação de resistência. Todos os

14 isolados avaliados como sensíveis pelo REMA, apresentaram o mesmo perfil pelo BACTEC MGIT 960. Entre os dois isolados resistentes pelo REMA, um também foi resistente pelo BACTEC MGIT 960, e o outro apresentou resistência intermediária (representando um erro menor). Dos 14 isolados que demonstraram resistência induzida pelo REMA, o protocolo BACTEC MGIT 960 reportou seis como resistentes intermediários, representando erros menores, e os oito restantes como resistentes. Aceitando os últimos resultados como corretos, então a taxa de concordância geral para claritromicina foi de 77%. As observações específicas em ambos os métodos para os 14 isolados resistentes induzidos estão detalhadas na Tabela 6. Não houve correlação aparente entre o tempo de incubação necessária para detectar a resistência induzida pelo método REMA e o tempo em dias em que o isolado foi relatado como resistente intermediário ou resistente pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST.

Tabela 9. Comparação entre o tempo de detecção da resistência induzida a claritromicina pelo método REMA e pelo protocolo desenvolvido para o BACTEC MGIT 960/ TB eXiST.

Isolado	Tempo para detecção da resistência induzida (Dias)			
	REMA	Perfil	MGIT 960	Perfil
1477	5	IR	9	I
3288	5	IR	6	I
5127	5	IR	6	I
2334	5	IR	4	R
3696	5	IR	3	R
2526 B	7	IR	5	R
3988	7	IR	6	R
2878	7	IR	6	R
818	10	R	12	I
2754	10	IR	9	I

307	10	IR	6	R
3872	10	IR	7	R
5720	10	IR	6	R
2335	14	IR	9	I

I: resistente intermediário, RI: resistente induzido, R: resistente.

4.4 Detecção da presença de plasmídeos nos isolados analisados

Foi observado que três isolados apresentaram plasmídeos pela análise em PFGE. O isolado 381, identificado como *M. abscessus* subsp. *massiliense*, apresentou dois plasmídeos, um com peso molecular aproximado de 50 kb e outro de 150 kb. O isolado 1527, identificado como *M. abscessus* subsp. *massiliense*, apresentou um plasmídeo de peso molecular aproximado de 250 kb. E o isolado 1189, identificado como *M. abscessus* subsp. *bolletii*, apresentou um plasmídeo de peso molecular aproximado de 125 kb (Figura 14).

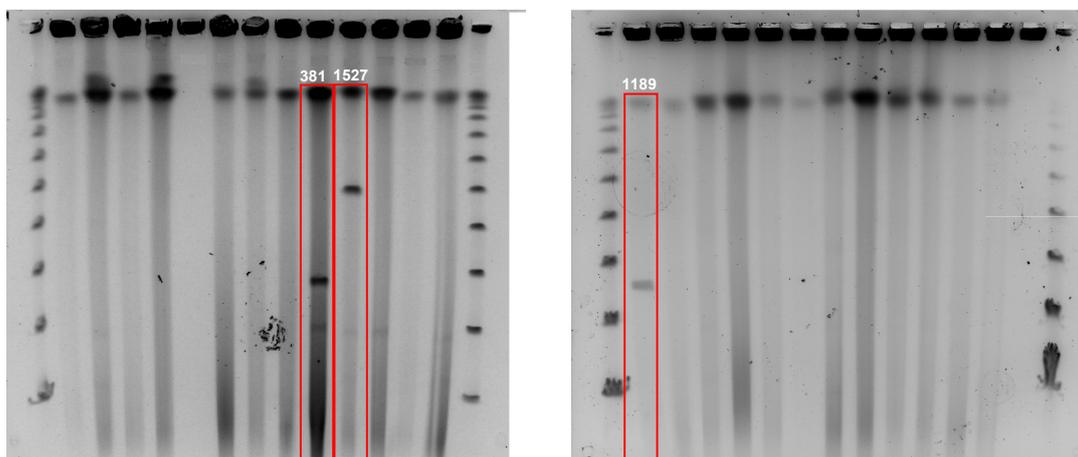


Figura 14. Imagem obtida após Pulsed Field Gel Electrophoresis em gel de agarose low melting a 1% com detecção de presença de plasmídeos. M: Marcador molecular Lambda PFGE (50-1.000 kb).

4.5 Sequenciamento de genoma completo

Os isolados que apresentaram possíveis plasmídeos pela técnica de PFGE foram selecionados para o sequenciamento genômico. Entretanto, o isolado 1527 não apresentou boa qualidade na extração de DNA e não foi possível ser sequenciado.

O isolado 381 apresentou dois contigs sugestivos de serem os possíveis plasmídeos detectados pela técnica de PFGE. O primeiro contig apresentou 95.709 pares de base com conteúdo de GC=62,72%.

A comparação com o banco de dados BLAST (Tabela 10) evidenciou que este contig apresentou 99,9% de similaridade com o fago Adler (Número de acesso KC960489.1).

Tabela 10. Comparação do primeiro contig do isolado 381 com o banco de dados BLAST.

Descrição	Max Score	Total Score	Cobertura	E- value	Identidade	Acesso
<i>Mycobacterium</i> fago Adler, genoma completo	1.767e+05	1.788e+05	100%	0.0	99.99%	KC960489.1

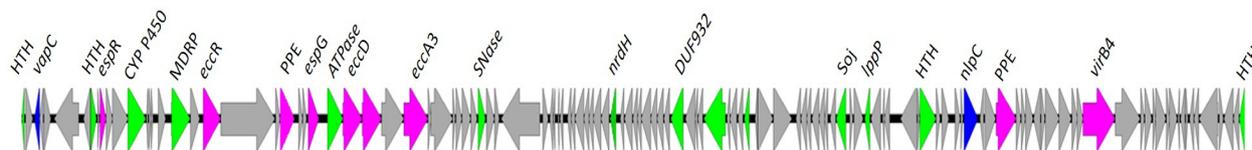


Figura 15. Ambiente genético do primeiro contig do isolado 381. As regiões codificadoras detectadas estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas rosas indicam genes que codificam proteínas

relacionadas a patogenicidade e virulência bacteriana, flechas verdes indicam genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo bacteriano, flechas azuis indicam enzimas relacionadas a mecanismos de proteção celular, flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida.

A maior parte das regiões codificadoras detectadas foram caracterizadas como proteínas hipotéticas, sem função conhecida. Foram detectados nove ORFs (*espR*, *eccR*, *espG*, *eccD*, *SASPM*, *nrdH*, *PPE*, *virB4*) relacionados a fatores de virulência e patogenicidade. Com exceção do *PPE* e *virB4*, todos os outros genes codificam proteínas relacionadas ao sistema de secreção ESX.

Outra região codificadora corresponde a família de proteínas *nlpC* que são encontradas em regiões de profago de genomas bacterianos ou em bacteriófagos. E foi identificada uma região codificante da família de proteínas *vapC* faz parte do sistema toxina-antitoxina (TA). Os demais genes estão relacionados com funções do metabolismo celular e regulação gênica.

O segundo contig do isolado 381 apresentou 53.821 pares de base e não houve compatibilidade com plasmídeos pelo banco PlasmidFinder, não foram encontrados genes de resistência pelo banco ResFinder, nem fatores de virulência pelo VirulenceFinder e sequências de inserção pelo ISFinder. No banco de dados Blast não houve compatibilidade significativa com sequências depositadas.

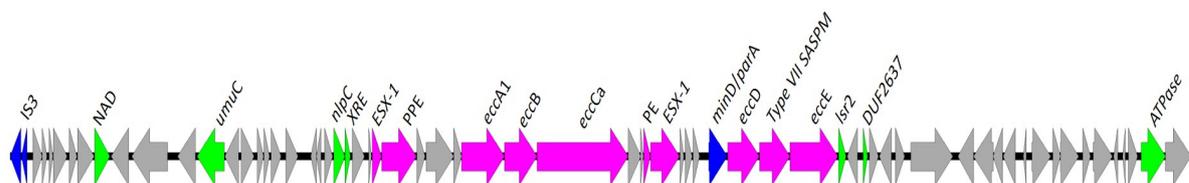


Figura 16. Ambiente genético do segundo contig do isolado 381. As regiões codificadoras detectadas estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas rosas indicam genes que codificam proteínas

relacionadas a patogenicidade bacteriana, flechas verdes indicam genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo bacteriano, flechas azuis indicam elementos móveis e transferases, flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida.

A maioria das regiões codificadoras detectadas foram caracterizadas como genes de proteínas hipotéticas. Este contig apresentou os mesmos genes relacionados a patogenicidade e virulência bacteriana que o primeiro contig. Entretanto, foram encontrados dois genes codificadores de transposases da família IS3/IS911. Foi identificada uma região codificadora da família de proteínas minD/parA. Os demais genes detectados estão envolvidos ao metabolismo celular e regulação gênica.

O isolado 1189 apresentou um único contig sugestivo de ser um possível plasmídeo. Este contig possui 131.906 pares de base e não houve compatibilidade com plasmídeos pelo PlasmidFinder, não foram encontrados genes de resistência pelo ResFinder, nem fatores de virulência pelo VirulenceFinder e sequências de inserção pelo ISFinder. No banco de dados Blast houve compatibilidade com genomas das espécies *M. abscessus* e *M. massiliense* (Tabela 11).

Tabela 11. Resultado de comparação do contig do isolado 1189 com sequências do banco de dados Blast.

Descrição	Score Max	Score total	Query cover	E- value	Ident	Acesso
<i>Mycobacteroides abscessus</i> cepa FLAC006	2.434e+05	2.456e+05	100%	0.0	99.97%	CP016188.1
<i>Mycobacteroides abscessus</i> cepa FLAC005	2.434e+05	2.436e+05	100%	0.0	99.97%	CP014952.1
<i>Mycobacteroides</i>	2.081e+05	2.323e+05	99%	0.0	98.53%	CP029073.1

<i>abscessus</i> cepa G122						
<i>Mycobacteroides</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> cepa GD01B	1.373e+05	2.487e+05	100%	0.0	99.79%	CP035924.1
<i>Mycobacteroides</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> cepa GD01A	1.373e+05	2.487e+05	100%	0.0	99.79%	CP035923.1
<i>Mycobacteroides</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> cepa FLAC047	1.373e+05	2.487e+05	100%	0.0	99.79%	CP021122.1

A maior parte das regiões codificadoras detectadas estão relacionadas ao metabolismo celular, síntese de proteínas e parede celular, bem como, genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários.

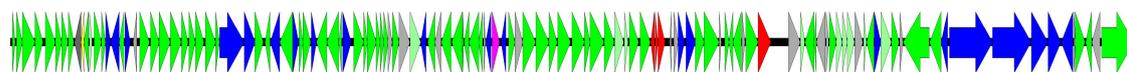


Figura 17. Ambiente genético do primeiro contig do isolado 1189. As regiões codificadoras detectadas estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas rosas indicam genes que codificam proteínas relacionadas a patogenicidade bacteriana, flechas verdes indicam genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo bacteriano, flechas vermelhas indicam elementos móveis e transferases, flechas azuis indicam enzimas relacionadas mecanismos de proteção celular e flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida.

Foram detectados genes reguladores transcricionais das famílias AcrR, AraC e TetR, e foram identificados dois genes que codificam proteínas transportadoras da família MFS e da família RND. Além disso, foi encontrado uma região que codifica uma enzima putativa do tipo carboxipeptidase Van-Y e subjacente a esta região codificadora, foi encontrada uma sequência que corresponde a uma metalo-hidrolase de classe B (MBL). Todas as regiões codificadoras dos três contigs analisados estão no Anexo 2.

4.6 Categorização dos isolados segundo tratamento dos pacientes

Uma vez que um paciente possua um resultado de baciloscopia positiva, o mesmo deverá ser notificado como caso de tuberculose. Esse fato acontece também para os casos de micobacterioses, pois a baciloscopia não identifica ao nível de espécie o agente etiológico. Portanto, a maioria dos casos de micobacterioses pode ser encontrada no banco de notificações para tuberculose.

Dentre os 29 pacientes dos quais foram obtidos os isolados do estudo, 14 (48,3%) apresentaram notificação no TBWeb, sendo 9 do sexo masculino (64,3%) e cinco do sexo feminino (35,7%). Todos os pacientes notificados receberam esquema de tratamento para tuberculose, com os fármacos Rifampicina, Isoniazida, Etambutol e Pirazinamida. Apenas dois pacientes tiveram mudança de diagnóstico para infecção causada por *M. abscessus*, com somente um paciente tratado com claritromicina. Este paciente refere-se ao isolado 2754, que foi categorizado como resistente de acordo com a classificação proposta, concordante com o perfil *in vitro* que apresentou resistência induzida a este fármaco.

5. Discussão

O grupo *M. abscessus* tem se tornado de grande importância clínica tanto pelo aumento da incidência e ampla variedade de suas infecções, quanto por sua elevada resistência, intrínseca e adquirida, a diversas classes de antibióticos (Forbes et al., 2018; Lopeman et al., 2019). Além disso, muito pouco é compreendido sobre a virulência, transmissão e persistência ambiental desses microrganismos, sendo necessário mais estudos, principalmente, visando novos tratamentos eficazes e seguros.

Apesar de recomendações terapêuticas por diretrizes nacionais e internacionais, há pouca evidência clínica de eficácia *in vivo*, culminando em tratamento falhos, e em muitos casos, em infecções persistentes e incuráveis. Devido a estes fatores, a realização de teste de suscetibilidade aos fármacos tornou-se mandatória para auxiliar na melhor opção terapêutica, mesmo com inconsistência entre atividade *in vitro* e *in vivo*.

Atualmente, a metodologia utilizada para o teste de suscetibilidade aos fármacos é a recomendada pelo CLSI, considerada o padrão ouro desde sua primeira publicação. Esta metodologia é baseada na menor concentração do fármaco capaz de inibir crescimento bacteriano, entretanto é uma técnica robusta exigindo tanto laboratório quanto profissional capacitado para sua implementação e realização. Outro fator a ser considerado é a detecção da resistência induzida a claritomicina, um dos principais fármacos do tratamento, que requer a extensão de incubação e monitoramento do teste de 3 a 14 dias.

Em busca de novas tecnologias práticas e reproduzíveis, o BACTEC MGIT 960 é um sistema automatizado originalmente aplicado ao teste de suscetibilidade aos fármacos para o complexo *M. tuberculosis* e, atualmente, é a metodologia recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009). Recentemente, o sistema foi aprimorado com o lançamento do software TB eXiST, que suporta o uso de múltiplos protocolos, incluindo aqueles desenvolvidos por usuários finais. Lucke e col. (2012) utilizaram pela primeira

vez este novo sistema para teste de suscetibilidade aos fármacos para micobactérias de crescimento lento, demonstrando seu potencial para o desenvolvimento de um protocolo para as micobactérias de crescimento rápido. Baseado nisto, este estudo teve como objetivo a avaliação de um protocolo de suscetibilidade aos fármacos para as espécies do grupo *M. abscessus* pelo sistema MGIT 960/TB eXiST, que posteriormente poderá ser aplicado para outras micobactérias de crescimento rápido.

Para o desenvolvimento do protocolo, foi utilizada a cepa padrão *M. abscessus* ATCC 19977^T para posteriormente aplicar o protocolo para 31 isolados clínicos identificados como pertencentes do grupo *M. abscessus* frente aos quatro principais fármacos (claritromicina, cefoxitina, imipenem e amicacina) utilizados no tratamento das infecções causadas por este grupo. Os resultados obtidos foram comparados com a técnica REMA, que consiste na metodologia recomendada pelo CLSI com a utilização de resazurina, um indicador de oxido-redução usado para avaliar crescimento celular, principalmente em testes de citotoxicidade (Sarker et al., 2007). A utilização da resazurina auxilia na leitura visual do teste, minimizando possíveis erros de leitura e permitindo uma leitura mais precisa. Também permite o desenvolvimento de protocolos de leitura automatizada devido à fluorescência emitida (Carvalho et al., 2016).

As interpretações foram feitas de acordo com os critérios especificados pelo CLSI para cada fármaco. Nas análises realizadas, não foram observados erros maiores ou muito maiores, ou seja, nenhum teste realizado pelo sistema MGIT 960/TB eXiST demonstrou falsa sensibilidade ou resistência quando comparados com o padrão ouro. Para todos os quatro fármacos, os resultados obtidos pelo sistema MGIT 960/TB eXiST foram estritamente concordantes em 44 (98%) dos 45 casos em que a técnica REMA indicou sensibilidade ao antibiótico. A única exceção foi um isolado sensível à cefoxitina, relatado como resistente intermediário pelo sistema MGIT 960/TB eXiST. Entre todas as comparações restantes, ambas as metodologias relataram resistência ou

resistência intermediária ou, no caso da claritromicina, resistência induzida. Assim, no geral, o sistema MGIT 960/TB eXiST forneceu corretamente a informação clinicamente relevante - antibiótico sensível ou não sensível - para 123 (99,2%) das 124 comparações dos fármacos testados, com a única exceção sendo na direção de uma discrepância conservadora.

A análise dos resultados para o fármaco claritromicina foi avaliada de uma forma mais criteriosa devido a presença do mecanismo de resistência induzida. O primeiro ponto a ser avaliado é o período de incubação do teste para a detecção desta resistência. 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, e, assim, seja expressa a resistência induzida. Essa produção só é detectada pela técnica REMA quando a incubação do teste é estendida por até 14 dias, período este que o sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST contempla devido ao protocolo de interpretação final do teste.

Foi observado que todos os isolados com resistência induzida pela técnica REMA foram relatados como resistentes (57%) ou resistentes intermediários (43%) pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST, mas não foi observada correlação aparente entre o dia de detecção desta resistência por ambos os protocolos.

Neste estudo consideramos concordante a interpretação de resistência intermediária e resistência induzida devido a conduta clínica aplicada em ambos os casos. Na presença da resistência induzida a claritromicina, é recomendado que este fármaco seja substituído por outro que tenha melhor atividade antibacteriana, enquanto nos casos de resistência intermediária é recomendado que haja uma adequação da dose, não excluindo sua utilização no tratamento. Se esta conduta for aplicada nos isolados considerados resistentes intermediários pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST, os quais são resistentes induzidos pela técnica REMA, é muito provável que o quadro clínico da infecção seja persistente, já que a presença do fármaco é estímulo para a ativação do gene *erm(41)*, responsável pela metilação do sítio de ligação da

claritromicina. Em virtude disso, sugerimos que os isolados resistentes intermediários sejam interpretados como resistentes para que a conduta terapêutica possa ser ajustada de acordo com o perfil de suscetibilidade do isolado.

Considerando, então, esses resultados como concordantes, a taxa de concordância geral para claritromicina entre ambos os protocolos aumentaria de 77% para 100%, ou seja, o sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST proporcionou o resultado clinicamente relevante sem a necessidade de modificar o fluxo de trabalho padronizado.

Em relação ao fármaco amicacina, todos os isolados apresentaram sensibilidade, com exceção de um único isolado *M. abscessus* subsp. *abscessus* que apresentou resistência. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos publicados por Zheng e col. (2018) e Wu e col. (2019), nos quais mostram que este fármaco apresenta elevada atividade bactericida em isolados do grupo *M. abscessus*.

Para o fármaco imipenem, todos os isolados (100%) foram resistentes, enquanto para cefoxitina apenas dois isolados (6,4%) foram sensíveis, sendo um isolado *M. abscessus* subsp. *abscessus* e o outro *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Dos isolados restantes, 28 apresentaram resistência intermediária (90,3%) e dois isolados foram resistentes. Estes dados são concordantes com a metanálise de Story-Roller e col. (2018), a qual avaliou 35 estudos que testaram β -lactâmicos frente isolados do grupo *M. abscessus*. Os autores observaram que na maioria dos estudos em que os fármacos imipenem e cefoxitina foram testados, os isolados apresentaram resistência. Em apenas quatro estudos foi observado que todos os isolados foram sensíveis ou resistentes intermediários a cefoxitina e outros dois estudos observaram que isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* foram sensíveis ou resistentes intermediários ao imipenem, enquanto isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* exibiram CIMs elevados para este fármaco.

A presença de plasmídeos não integrados nos cromossomos dos isolados analisados foi verificada utilizando a técnica PFGE (Viana-Niero et al., 2008) e teve como objetivo identificar possíveis interferentes genéticos no perfil de suscetibilidade a claritromicina. Dos 31 isolados analisados, apenas em três foi observada a presença de plasmídeos, os quais foram posteriormente submetidos ao sequenciamento genômico total, com exceção do isolado 1527 que não apresentou boa qualidade na extração de DNA e não pôde ser sequenciado.

O isolado 381 apresentou dois contigs sugestivos de serem plasmídeos, sendo que um deles apresentou 99,9% de similaridade com o fago Adler (número de acesso Genbank: KC960489.1). Este fago foi depositado por Cerdeira e colaboradores em 2013, entretanto nenhuma descrição foi relatada.

A maior parte das regiões codificadoras detectadas foram caracterizadas como proteínas hipotéticas, sem função conhecida. Foram detectados nove genes (espR, eccR, espG, eccD, SASPM, nrdH, PPE, virB4) relacionados a fatores de virulência e patogenicidade. Com exceção do gene PPE e virB4, todos os outros genes codificam proteínas relacionadas ao sistema de secreção ESX. Este sistema é responsável pelo transporte de proteínas através da espessa e complexa parede celular das micobactérias. Alguns destes sistemas de secreção estão envolvidos na virulência e sobrevivência bacteriana (Chen, 2016).

Em micobactérias patogênicas de crescimento lento, como *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium marinum*, existem cinco sistemas de secreção do tipo VII, chamados ESX-1 a ESX-5. O sistema ESX-1 é o mais estudado devido à sua importante função na virulência, que está ligada, pelo menos em parte, à capacidade de uma de suas proteínas efetoras segregadas, EsxA, induzir ruptura de fagossomos em fagócitos do hospedeiro (Gröschel et al., 2016; Chen, 2016). Este sistema também já foi descrito em micobactérias não patogênicas de crescimento rápido, como *Mycobacterium*

smegmatis, no qual estão envolvidas na transferência conjugal de DNA (Gröschel et al., 2016).

O gene PPE codifica proteínas que desempenham um papel na evasão das respostas imunes do hospedeiro, possivelmente via variação antigênica, e estão associadas ao sistema ESX (Sampson, 2011). Já as proteínas da família VirB4 são codificadas por plasmídeos conjugativos e por sistemas de secreção do tipo IV, que especificam a exportação de macromoléculas relacionadas a sistemas de conjugação e têm papel importante na rápida disseminação de genes de resistência a antibióticos e determinantes de virulência (Christie et al., 2014).

Neste mesmo contig também foi encontrada uma região codificadora da família de proteínas nlpC, que são encontradas em regiões de profago de genomas bacterianos ou em bacteriófagos. Estas proteínas são enzimas denominadas hidrolases conhecidas por sua capacidade de degradar a parede celular da célula hospedeira e, recentemente, por serem potentes agentes antibacterianos (Anantharaman & Aravind, 2003).

Outra região detectada codifica a família de toxinas vapC do tipo II do sistema toxina-antitoxina (TA). Os sistemas TA são tipicamente codificados em operons que estão localizados em plasmídeos bacterianos e cromossomos. Os operons consistem em genes adjacentes de toxina e antitoxina. As toxinas têm diversas funções celulares, tais como inibições da síntese de proteínas, replicação de DNA e síntese da parede celular em resposta a condições de crescimento desfavoráveis. Muitas toxinas são ribonucleases que degradam o mRNA de maneira específica ou inespecífica, e algumas toxinas atuam como inibidores da girase e quinases. Os módulos TA cromossômicos podem atuar na fisiologia do estresse, servindo como reguladores metabólicos do crescimento e como mecanismo adaptativo á diversas condições ambientais (Leplae et al., 2011; Lee & Lee, 2016; Jurénas et al., 2017).

Os genes TA no plasmídeo são transferidos horizontalmente com frequência, conferindo resistência a antibióticos e virulência em bactérias

patogênicas. Além disso, os genes TA em cromossomos de vários procariontes mostram funções celulares amplas, que respondem a diversos ambientes estressantes, como deficiência de nutrientes, tratamento antibiótico, infecção por bacteriófagos, ataque do sistema imunológico, estresse oxidativo e alta temperatura. Dependendo dos tipos de sistemas de TA, a ativação da toxina pode eventualmente causar crescimento lento das células ou parada do ciclo celular, como é mais frequentemente encontrado em células dormentes. Uma hipótese mais aceita é a de que a toxina é responsável pela parada celular, superando a adversidade temporária (Leplae et al., 2011; Lee & Lee, 2016; Jurénas et al., 2017).

Por exemplo, o *M. tuberculosis* abriga pelo menos 30 operons de TA funcionais que cobrem cinco famílias de toxinas (MazEF, RelBE, ParDE, HigBA e VapBC), enquanto a espécie *M. smegmatis* de crescimento mais rápido possui apenas três operons de TA funcionais. A célula dormente que tem uma baixa atividade metabólica torna-se parcial ou totalmente insensível ao mecanismo de ação dos fármacos, tornando muitas bactérias patogênicas resistentes a multi-drogas. Este estado fisiológico pode voltar a um estado crescente quando os fármacos são eliminados (Leplae et al., 2011; Lee & Lee, 2016; Jurénas et al., 2017).

Os sistemas TA múltiplos também estão relacionados à formação de biofilme de bactérias patogênicas humanas, o que as capacita a resistir a antimicrobianos e a ataques imunes. Com base nas características estruturais e funcionais da toxina, os módulos TA bacterianos tipo II podem ser categorizados em oito superfamílias (RelBE, MazEF, VapBC, CCDAB, ParDE, HigAB, HipBA e Phd-Doc) e foram originalmente descobertos em plasmídeos bacterianos no final dos anos 80. A função desses módulos é garantir a manutenção do plasmídeo no crescimento de populações bacterianas. Eles agem matando as bactérias-filhas desprovidas de plasmídeo (Leplae et al., 2011; Lee & Lee, 2016; Jurénas et al., 2017).

As demais regiões codificadoras encontradas no primeiro contig no isolado 381 estão relacionadas com funções do metabolismo celular e regulação gênica.

O segundo contig do isolado 381 apresentou 53.821 pares de base e não houve compatibilidade com plasmídeos pelo banco PlasmidFinder, não foram encontrados genes de resistência pelo banco ResFinder, nem fatores de virulência pelo VirulenceFinder e sequências de inserção pelo ISFinder. No banco de dados Blast não houve compatibilidade significativa com sequências depositadas.

A maioria das regiões codificadoras detectadas foram caracterizadas como genes de proteínas hipotéticas. Este contig apresentou os mesmos genes relacionados a patogenicidade e virulência bacteriana que o primeiro contig. Entretanto, foram encontrados dois genes codificadores de transposases da família IS3/IS911, que consistem em vários elementos de inserção de *Escherichia coli* e outras transposases bacterianas (Chandler et al. 2015). A presença destes elementos sugerem que as micobactérias são capazes de troca de material genético com outros gêneros bacterianos, e talvez, com uma frequência maior do já descrito.

Outra região encontrada codifica a família de ATPases minD/parA que estão envolvidas na segregação de cromossomos e plasmídeos (Lutkenhaus, 2012). Os demais genes detectados estão envolvidos com o metabolismo celular e regulação gênica.

O isolado 1189 apresentou um único contig sugestivo de ser um plasmídeo. Este contig possui 131.906 pares de base e não houve compatibilidade com plasmídeos pelo PlasmidFinder, não foram encontrados genes de resistência pelo ResFinder, nem fatores de virulência pelo VirulenceFinder e sequências de inserção pelo ISFinder. No banco de dados Blast houve compatibilidade com genomas das espécies *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

Foram detectados genes reguladores transcricionais (TRF) das famílias AcrR, AraC e TetR. Estas famílias envolvem proteínas e polipeptídeos que regulam o metabolismo do carbono, resposta ao estresse e patogênese. O regulador AcrR está associado a expressão do complexo de efluxo AcrAB, que protege a parede celular de substâncias tóxicas (Deng et al., 2013).

Em especial, a família TetR atua como sensores químicos para monitorar tanto a dinâmica ambiental celular quanto seus genes regulados, subjacentes a muitos eventos, tais como produção de antibióticos, estresse osmótico, bombas de efluxo, resistência a múltiplos fármacos, modulação metabólica e patogênese. A primeira TetR foi reportada como reguladora da bomba de efluxo de tetraciclina, resultando na indução da resistência a tetraciclina em *E. coli*. No entanto, em relação às micobactérias, apesar do genoma de *M. tuberculosis* codificar 14 membros da família TetR, pouco se sabe sobre suas funções. Algumas foram confirmadas estarem envolvidas no metabolismo de lipídeos, como a *kstR* e *MceR*. Estudos com objetivo de compreenderem a patogenicidade do *M. tuberculosis* observaram que a bactéria utiliza lipídeos como fonte de carbono *in vivo* por meio da indução de enzimas envolvidas na degradação de ácidos graxos durante a infecção e que a deleção dos genes envolvidos no metabolismo dos lipídeos causa uma severa atenuação em modelos de infecção (Deng et al., 2013).

Em alguns gêneros, observamos uma ampla variação no número de TFRs em diferentes espécies. Por exemplo, o *M. tuberculosis* codifica 49 TFRs, enquanto *M. leprae*, conhecido por ter um genoma reduzido, codifica apenas 10 e os isolados ambientais *M. abscessus* e *M. smegmatis* codificam 138 e 137 TFRs, respectivamente. Estes dados indicam uma tendência geral de que o número de TFRs codificados por um organismo pode refletir a diversidade das condições ambientais em que o organismo vive (Cuthbertson e Nodwell, 2013).

Foram encontrados dois genes que codificam proteínas transportadoras envolvidas no transporte de diversos compostos desde carboidratos, álcoois orgânicos e ácidos. O transportador da família MFS (major facilitator

superfamily) é conhecido principalmente pela sua função na absorção de açúcares, mas recentemente foi envolvido em sistemas de efluxo de fármacos, metabólitos do ciclo de Krebs e organofosforados. Já o transportador da família RND (Resistance-Nodulation-Division) é uma categoria de bombas de efluxo bacteriano envolvida na manutenção da homeostase da célula, na remoção de compostos tóxicos e na exportação de determinantes de virulência. Estas famílias de transportadores são comumente encontradas em bactérias gram-negativas (Nikaido, 2011).

Foi encontrada uma região que codifica uma enzima putativa do tipo carboxipeptidase Van-Y, que são enzimas metalo-peptidases envolvidas no metabolismo celular e na biossíntese da parede celular. O gene codificador desta enzima é membro do grupo de genes de resistência de alto nível à vancomicina encontrado no plasmídeo pIP816 em *Enterococcus faecium* BM4147 (Arhtur et al., 1992).

Subjacente a esta região codificadora, foi encontrada uma sequência que corresponde a uma metalo-hidrolase (MBL), que são enzimas hidrolíticas que desempenham uma variedade de funções biológicas, dentre as quais podem catalisar uma ampla gama de antibióticos beta-lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e cefamicinas (Page & Badarau, 2008; Palzkill, 2013).

Diferentemente das β -lactamases descritas em micobactérias, Bla_{Mab} (Soroka et al., 2014), BlaC (Hackbarth et al., 1997), BlaF (Galleni et al., 1994) e BlaS (Basu et al. 1997), que pertencem a classe A de Ambler, esta metalo-hidrolase pertence a classe B de β -lactamases. Esta classe requer íons de zinco para catalisar a hidrólise de β -lactâmicos e não têm sequência ou homologia estrutural com as serina - β -lactamases (Page & Badarau, 2008; Palzkill, 2013).

A primeira metalo- β -lactamase a ser descoberta foi produzida por uma linhagem inócua de *Bacillus cereus*, mas nos últimos 20 anos, resistências mediadas por MBL têm sido cada vez mais descritas em várias bactérias

patogênicas e têm se espalhado rapidamente por transferência horizontal, envolvendo ambos plasmídeos e elementos genéticos integron. As MBLs representam uma enorme ameaça clínica a terapia baseada em antibióticos β -lactâmicos, já que não existem inibidores clinicamente úteis para eles (Page & Badarau, 2008; Palzkill, 2013).

As MBLs podem ser divididas em três subclasses: subclasse B1, B2 e B3 com base em suas sequências de aminoácidos, substrato e ions necessários. Subclasse B1 é a maior e contém várias β -lactamases bem estudadas: BCII de *Bacillus cereus*, CcrA de *Bacteroides fragilis*, IMP-1, SPM-1 de *Pseudomonas aeruginosa* e BlaB de *Cryobacterium meningosepticum*. Os representantes mais comuns da subclasse B2 são CphA de *Aeromonas hydrophila* e ImiS de *Aeromonas veronii*, que preferencialmente hidrolisam carbapenêmicos, mas têm pouca atividade contra penicilinas e cefalosporinas. Finalmente, a subclasse B3 contém a única β -lactamase de zinco tetramérica conhecida, a enzima L1 de *Stenotrophomonas maltophilia* e a FEZ-1 monomérica de *Legionella gormanii* (Page & Badarau, 2008; Palzkill, 2013).

A presença desta metalo β -lactamase juntamente com os outros mecanismos de resistência presentes no contig do isolado 1189, podem estar relacionados com a resistência deste isolado aos fármacos cefoxitina e imipenem. Este isolado foi sensível tanto a amicacina como a claritromicina, sendo este último fármaco relacionado à deleção no gene *erm(41)*.

Em contrapartida, o isolado 381 foi resistente somente ao fármaco imipenem, na qual esta resistência pode estar envolvida com os sistemas de excreção ESX presentes nos contigs. Este isolado foi identificado como *M. abscessus* subsp. *massiliense*, o qual apresenta deleção no gene *erm(41)*, que confere o perfil sensível à claritromicina.

Apesar destes mecanismos de resistência terem sido encontrados nos supostos plasmídeos, esses foram descritos primordialmente em DNA cromossômico de micobactérias, sugerindo que os mesmos podem ser encontrados nos isolados que não foram identificados possíveis plasmídeos.

Esta hipótese, pode explicar a elevada resistência desses isolados aos fármacos cefoxitina e imipenem, bem como a claritromicina, apesar da integridade do gene *erm*(41).

A elevada resistência aos β -lactâmicos e a claritromicina, levanta o questionamento sobre as recomendações disponíveis de tratamento das infecções causadas pelo grupo *M. abscessus*, já que três dos quatro fármacos preconizados apresentam baixa ou nenhuma atividade bactericida. Esta observação não foi constatada somente neste estudo, visto os inúmeros estudos que demonstram a escassa atividade antibacteriana destes antibióticos. Estes dados enaltecem a grande necessidade de medicamentos eficazes e seguros e que apresentem correlação *in vitro* e *in vivo*.

Em relação à caracterização dos pacientes de acordo com o tratamento, foi observado que dos 29 pacientes que foram obtidos os isolados do estudo, 14 (48,3%) apresentaram notificação no TBWeb. Todos estes pacientes notificados receberam esquema de tratamento para tuberculose. Apenas dois pacientes tiveram mudança de diagnóstico para infecção causada por *M. abscessus*, com somente um paciente tratado com claritromicina. Este paciente refere-se ao isolado 2754, que foi categorizado como resistente de acordo com a classificação proposta, concordante com o perfil *in vitro* de resistência induzida.

Existem dois fatores que possivelmente podem estar relacionados com os casos de infecções pulmonares por MNTs serem notificadas como tuberculose, sendo eles a apresentação clínica do paciente e a baciloscopia positiva, a qual se realiza a pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Em alguns casos de infecções pulmonares por MNT a sintomatologia e os achados no exame de raio-X podem assemelhar-se ao quadro clínico da tuberculose, o que pode levar o médico a suspeitar desta doença. Nestes casos, geralmente é solicitada a baciloscopia para confirmar a suspeita clínica, e se baciloscopia for positiva, o caso é notificado como tuberculose e inicia-se o tratamento. Mesmo nos casos de baciloscopia negativa, o médico pode optar

por notificar o caso e iniciar o tratamento, já que a baciloscopia tem sensibilidade muito variável (60 – 80%), e se a cultura para micobactérias foi solicitada, esta pode levar até 60 dias para o resultado final. Como a tuberculose é uma doença grave de transmissão aérea, assim que o diagnóstico é dado, o paciente precisa ser isolado e o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível.

Outro ponto importante é que a mudança de diagnóstico geralmente ocorre quando há identificação do microrganismo em cultura e a valorização do mesmo, o que pode explicar que apenas dois pacientes tiveram mudança de diagnóstico para infecção por *M. abscessus*. A realização de cultura para micobactérias deve ser feita para toda suspeita de tuberculose ou outras micobacterioses, mas este exame nem sempre é realizado, sendo solicitado principalmente em casos de resistência ao tratamento, já que é necessária a realização de teste de suscetibilidade aos fármacos.

Podemos observar que o diagnóstico de micobacterioses é complexo e requer que profissionais da saúde, desde médicos a microbiologistas, sejam capacitados quanto as peculiaridades destes microrganismos. Este quadro ainda se agrava nos casos de infecções pelo grupo *M. abscessus* em razão da elevada resistência às diversas classes de antibióticos, inclusive aqueles preconizados.

6. Conclusão

- O protocolo desenvolvido para isolados do grupo *M. abscessus* utilizando o sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST apresentou resultados concordantes com o método padrão descrito pelo CLSI adaptado (REMA);

- A utilização do sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST para isolados do grupo *M. abscessus* foi possível após padronização do crescimento em tubo sem adição de OADC;
- Os resultados obtidos pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST sugerem a possível aplicabilidade do mesmo para teste de suscetibilidade aos fármacos para micobactérias de crescimento rápido, mas estudos de escala maior são necessários para confirmar a robustez da metodologia descrita no presente estudo;
- O presente estudo mostrou que isolados com resistência ou resistência induzida a claritromicina podem ser detectados pelo sistema BACTEC MGIT 960/TB eXiST a partir do que é considerado como resistência intermediária. No entanto, esse achado deve ser avaliado em uma população maior para que possa ser validado.
- O sequenciamento genômico permitiu a identificação de diversos tipos de mecanismos de proteção bacteriano, incluindo uma metalo β -lactamase, que refletem o elevado perfil resistente dos isolados, bem como a elevada capacidade das micobactérias de resistirem a diversas condições ambientais.

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: 10/06/2019.

Akyar I, Çavuşoğlu C, Ayaş M, Sürücüoğlu S, İlki A, Kaya DE, Beşli Y. Evaluation of the performance of MALDI-TOF MS and DNA sequence analysis in the identification of mycobacteria species. *Turk J Med Sci.* 2018;48(6):1351-1357.

Anantharaman, V., Aravind, L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biol.* 2003; 4(2): R11.

Arthur, M., Molinas, C., Courvalin, P. "Sequence of the vanY gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147". *Gene.* 1992;120 (1): 111–4.

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/hm/cve_tb.html. Data acesso: 17/10/2019.

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, A.C., Bryant, J.M., Einer-Jensen, K., Holdstock, J., Houniet, D.T., Chan, J.Z., Depledge, D.P., Nikolayevskyy, V., Broda, A., Stone, M.J., Christiansen, M.T., Williams, R., McAndrew, M.B., Tutill, H., Brown, J., Melzer, M., Rosmarin, C., McHugh, T.D., Shorten, R.J., Drobniewski, F., Speight, G., Breuer, J. Rapid Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Directly from Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* 2015 Jul;53(7):2230-7.

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.

Brown-Elliott B.A., Fritsche T.R., Olson B.J., Vasireddy S., Vasireddy R., Iakhiaeva E., Alame D., Wallace R.J., Branda J.A. Comparison of Two Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *Am J Clin Pathol.* 2019; pii: aqz073.

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.

Carvalho, N.F.G, Pavan, F., Sato, D.N., Leite, C.Q.F., Arbeit, R.D., Chimara, E. Genetic correlates of clarithromycin susceptibility among isolates of the *Mycobacterium abscessus* group and the potential clinical applicability of a PCR-based analysis of *erm*(41). *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 862–866

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.

Chakraborty, P., Kumar, A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microb Cell*. 2019;6(2):105-122.

Chandler, M., Fayet, O., Rousseau, P., Ton Hoang B., Duval-Valentin G. Copy-out-Paste-in Transposition of IS911: A Major Transposition Pathway. *Microbiol Spectr*. 2015 Aug;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0031-2014.

Chen, L.F., Kaye, D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; 23:1053–75.

Chen, J.M. Mycosins of the Mycobacterial Type VII ESX Secretion System: the Glue That Holds the Party Together. *mBio*. 2016 Nov-Dec; 7(6): e02062-16.

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.

Christie, P.J., Whitaker, N., González-Rivera, C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(8):1578-91.

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-Third Edition*. NCCLS document M24 (ISBN 978-1-68440-025-6). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters - 5th ed. M23-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2018.

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. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(4):390-4.

Cuthbertson, L., Nodwell, J.R. The TetR Family of Regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2013;77(3): 440 – 475.

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

Daffe, M.; Draper, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 1998;39: 131–203.

De Rossi, E.; Ainsa, J.A.; Riccardi, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: An unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006;30:36–52.

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.

Dubée, V., Bernut, A., Cortes M. β -lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70: 1051-1058.

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.

Floto, R.A., Olivier, K.N., Saiman, L., et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous Mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. *Thorax.* 2016; 71:88–90.

Forbes, B.A., Hall, G.S., Miller, M.B., Novak, S.M., Rowlinson, M.C., Salfinger, M., Somoskovi, A., Warshauer, D.M., Wilson, M.L. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(2): pii: e00038-17.

Garcia de Carvalho, N.F., Sato, D.N., Pavan, F.R., Ferrazoli, L., Chimara, E. Resazurin Microtiter Assay for Clarithromycin Susceptibility Testing of Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus* Group. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(5):751-5.

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 planktonic 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.

Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. 2016. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat Rev Microbiol* 14:677–691.

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, C.W., Mah, T. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 2017; 41(3): 276–301.

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.

Hartmann, R., Holtje, J.V., Schwarz, U. Targets of penicillin action in *Escherichia coli*. *Nature.* 1972;235: 426-429.

Haworth, C.S.; Banks, J.; Capstick, T.; Fisher, A.J.; Gorsuch, T.; Laurenson, I.F.; Leitch, A.; Loebinger, M.R.; Milburn, H.J.; Nightingale, M.; et al. British Thoracic Society Guideline for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *BMJ Open Respir. Res.* 2017, 4, 1–12.

Heginbotham, 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.

Jarlier, V.; Nikaido, H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994; 123:11–18.

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.

Jhun BW, Yang B, Moon SM, , Lee H, Park HY, Jeon K, Kwon OJ, Ahn J, Moon IJ, Shin SJ, Daley CL, Koh WJ. Amikacin inhalation as salvage therapy for refractory nontuberculous mycobacterial lung disease. Antimicrob Agents Chemother. 2018; 62: e00011-18.

Jurénaš, D., Garcia-Pino, A., Van Melderen, L. Novel toxins from type II toxin-antitoxin systems with acetyltransferase activity. Plasmid. 2017;93:30-35.

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 bollettii* 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 bollettii* 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.

Koh WJ, Stout JE, Yew WW. Advances in the management of pulmonary disease due to *Mycobacterium abscessus* complex. Int J Tuberc Lung Dis 2014; 18:1141–8.

Koh WJ, Jeong BH, Kim SY, et al. Mycobacterial characteristics and treatment outcomes in *Mycobacterium abscessus* lung disease. Clin Infect Dis 2017; 64:309–16.

Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 3249–56.

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.

Lawn, S.D., Zumla, A.I. Tuberculosis. Lancet. 2011;378: 57-72.

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.

Lee, K.Y., Lee, B.J. Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin-Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria. Toxins. 2016; 8(10). pii: E305.

Leplae, R.I., Damien Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Pierre Drèze, P., Van Melderen, L. Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. Nucleic Acids Research. 2011;39(13): 5513–5525.

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.

Lopeman R.C., Harrison J., Desai M., Cox J.A.G. Mycobacterium abscessus: Environmental Bacterium Turned Clinical Nightmare. Microorganisms. 2019 Mar 22;7(3). pii: E90.

Louw, G.E., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., McEvoy, C.R., Van Helden, P.D., Victor, T.C. A Balancing Act: Efflux/Influx in Mycobacterial Drug Resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53: 3181–3189.

Lutkenhaus J. The ParA/MinD family puts things in their place. Trends Microbiol. 2012;20(9):411-8.

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.

- Morales, M.P.F., Lim, C.K., Shephard, L., Weldhagen, G.F. Mycobacterial inactivation protein extraction protocol for matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight characterization of clinical isolates. *Int J Mycobacteriol.* 2018;7(3):217-221.
- Mougari, F., Bouziane, F., Crockett, F., Nessar, R., Chau, F., Verizis, N., Sapriel, G., Raskine, L., Cambau, E. Selection of Resistance to Clarithromycin in *Mycobacterium abscessus* Subspecies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Dec 27;61(1). pii: e00943-16.
- 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.
- Nathavitharana R.R., Strnad L., Lederer P.A., Shah M., Hurtado R.M. Top Questions in the Diagnosis and Treatment of Pulmonary *M. abscessus* Disease. *Open Forum Infect Dis.* 2019 May 14;6(7):ofz221.
- Nessar, R., Cambau, E., Reytrat, J.M., Murray, A., Gicquel, B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):810-818.
- Nguyen, L., Thompson, C.J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: The mycobacteria paradigm. *Trends Microbiol.* 2006; 14: 304–312.
- Nikaido, H. Structure and mechanism of *rnd*-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 2011;77: 1–60.
- 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.
- Page, M.I., Badarau, A. The mechanisms of catalysis by metallo beta-lactamases. *Bioinorg Chem Appl.* 2008:576297.

- 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.
- Palzkill, T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1277:91-104.
- Park J, Cho J, Lee CH, et al. Progression and treatment outcomes of lung disease caused by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. *Clin Infect Dis.* 2017; 64:301–8.
- Pasca, M.R., Guglielame, P., De Rossi, E., Zara, F., Riccardi, G. mmpL7 Gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49: 4775–4777.
- 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* 2015; pp. 536-569.
- Pourahmad, F., Thompson, K. D., Adams, A., Richards, R. H. Comparative evaluation os 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.
- Prammananan T, Sander P, Brown BA et al. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis.* 1998;177: 1573–81.
- Primm, T.P., Lucero C.A., Falkinham J.O., 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):98-106.
- Ramirez, A., Ruggiero, M., Aranaga, C., Cataldi, A., Gutkind, G., De Waard, J.H., Biochemical characterization of β -lactamses from *Mycobacterium abscessus* complex and genetic environmental os the β -lactamase-encoding gene. *Drug Resist.* 2017;23: 294-300.

Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., Macheras, E., Heym, B., Herrmann, J.L., Daffe, M. Non Mycobacterial Virulence Genes in the Genome of the Emerging Pathogen *Mycobacterium abscessus*. PLoS ONE. 2009; 4:e5660.

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.

Rotcheewaphan, S., Lemon, J.K., Desai, U.U., Henderson, C.M., Zelazny, A.M. Rapid one-step protein extraction method for the identification of mycobacteria using MALDI-TOF MS. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019;94(4):355-360.

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

Sampson, S.L. Mycobacterial PE/PPE Proteins at the Host-Pathogen Interface. Clin Dev Immunol. 2011; 2011: 497203.

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.

Somoskovi, A., Dormandy J., Rivenburg, J., Pedrosa M., McBride, M., Salfinger, M. Direct comparison of the GenoType MTBC and genomic deletion assay in terms of ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2008;46: 1854-1857.

Soroka, D., Dubée, V., Soulier-Escrihuela O., Cuinet, G., Hugonnet J.E., Gutmann, L. Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A β -lactamase. J Antimicrob Chemother. 2014;69: 691-696.

Story-Roller, E., Maggioncalda, E.C., Cohen, K.A., Lamicchane, G. *Mycobacterium abscessus* and β -lactams: Emerging insights and potential opportunities. Front Microbiol. 2018;9: 2273

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.

Strnad L, Winthrop KL. Treatment of *Mycobacterium abscessus* complex. Semin Respir Crit Care Med 2018; 39:362–76.

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.

Viana-Niero, C., Lima, K.V., Lopes, M.L., Rabello, M.C., Marsola, L.R., Brillhante, V.C., Durham, A.M., Leão, S.C. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. J Clin Microbiol. 2008;46(3):850-5.

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 different regions of Japan and susceptibility of these isolates to antimicrobial agents. 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)

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Utilização do sistema MGIT 960 TB eXIST como teste de suscetibilidade a fármacos para Mycobacterium abscessus: padronização e avaliação	
Pesquisador: Erica Chimara	
Área Temática:	
Versão: 2	
CAAE: 35101614.8.0000.0059	
Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz	
Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 923.823	
Data da Relatoria: 17/12/2014	
Apresentação do Projeto: idem à relatoria anterior	
Objetivo da Pesquisa: idem à relatoria anterior	
Avaliação dos Riscos e Benefícios: idem à relatoria anterior	
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: idem à relatoria anterior	
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram apresentados os seguintes documentos e declarações: <ul style="list-style-type: none">- Folha de rosto - de acordo.- Justificativa de dispensa do TCLE - aceita.- Aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL corroborada pela diretoria geral da instituição - apresentada.- Termo de sigilo e confidencialidade - apresentado.- Termos de anuência de pesquisadores colaboradores - apresentados	
Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90	
Bairro: Cerqueira César	CEP: 01.246-902
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859	Fax: (11)3085-3505
E-mail: cepial@ial.sp.gov.br	

Continuação do Parecer: 923.823

Recomendações:

nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A coordenadora anexou os documentos solicitados na relatoria anterior a saber: termo de sigilo e confidencialidade e termos de anuência dos pesquisadores colaboradores.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 923.823

SAO PAULO, 19 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Maria de Fátima Costa Pires
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Anexo 2. Anotações dos contigs encontrados nos isolados 381 e 1189.

381 contig 1

CDS	BLAST	IDENTIDADE	COBERTURA	E-VALEU
complement (3..221)	helix-turn-helix domain-containing protein	100%	69%	1e-24
complement (997..1407)	type II toxin-antitoxin system VapC family toxin	100%	100%	7e-91
5400..5867	helix-turn-helix domain-containing protein	100%	100%	2e-106
6128..6607	ESX-1 secreted protein regulator EspR	100%	100%	1e-109
8326..9741	NADPH-cytochrome P450 reductase	100%	100%	0.0
11716..13191	multi-domain regulatory protein	100%	72%	1e-172
14205..15596	type VII secretion protein EccB	100%	100%	0.0
20242..21357	PPE domain-containing protein	100%	99%	0.0
22421..23269	ESX secretion-associated protein EspG	100%	100%	0.0
23930..25150	ATPase	100%	100%	0.0
25147..26646	type VII secretion integral membrane protein EccD	98.8%	100%	0.0
26649..28166	type VII secretion-associated serine protease mycosin	100%	100%	0.0
29904..31805	type VII secretion AAA-ATPase EccA	100%	100%	0.0
35736..36305	micrococcal nuclease-like nuclease	100%	91%	2e-125
complement (46084..46494)	Glutaredoxin-like protein NrdH	100%	100%	2e-96
complement (50789..51760)	DUF932 domain-containing protein	100%	100%	0.0
complement (53374..55083)	ParB/RepB/SpoIJ family partition protein			

complement (56547..56939)	Single-stranded DNA-binding protein	100%	100%	9e-90
complement (63724..64503)	Soj family ATPase	99.61%	100%	0.0
complement (65967..66383)	Lipoprotein LppP	100%	100%	3e-94
70279..71571	helix-turn-helix transcriptional regulator	100%	100%	0.0
73753..74826	NlpC/P60 family protein	100%	100%	0.0
76246..77832	PPE domain-containing protein	99.43%	100%	0.0
83044..85578	Type IV secretory pathway, VirB4 components	99.53%	100%	0.0
complement (95278..95709)	helix-turn-helix domain-containing protein	100%	100%	3e-99

381 contig 2

CDS	BLAST	IDENTIDADE	COBERTURA	E-VALEU
complement (1..492)	IS3 family transposase	100%	100%	8E-116
complement (522..767)	Transposase, IS3/IS911 family	98,75%	100%	1E-46
3841..4521	NAD-dependent deacylase	100%	100%	5E-164
complement (8478..9710)	putative DNA-damage-inducible protein P DINP	100%	100%	0.0
14681..15184	NlpC/P60 family protein	100%	100%	2E-119
15186..15428	XRE family transcriptional regulator	98,70%	96%	7E-47
16426..16845	ESX-1 secretion-associated protein	100%	79%	3E-69
16846..18423	PPE domain-contain protein (Mycobacterium abcessus)	100%	100%	0.0
20469..22412	type VII secretion AAA-ATPase EccA	100%	100%	0.0

22412..23893	type VII secretion protein EccB	100%	100%	0.0
23890..28029	type VII secretion protein EccCa	100%	100%	0.0
28721..29023	PE domain-containing protein (Mycobacterium abscessus)	100%	100%	2e-57
29039..30355	PPE family protein - Gating protein PPE68, component of Type VII secretion system ESX-1	100%	100%	0.0
31674..32510	MinD/ParA family protein [Mycobacteroides abscessus]	99,64%	100%	0.0
32538..33971	type VII secretion integral membrane protein EccD [Mycobacteroides abscessus]	100%	100%	0.0
33974..35353	type VII secretion-associated serine protease mycosin [Mycobacteroides abscessus]	100%	100%	0.0
35350..37527	type VII secretion protein EccE [Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus]	100%	100%	0.0
37566..37898	Lsr2 family protein [Mycobacteroides abscessus] - gene expression	100%	100%	9e-76
38669..38875	DUF2637 domain-containing protein [Mycobacteroides abscessus]	98.53%	100%	1e-37
47611..48441	PAPS reductase/FAD synthetase family protein [Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus]	100%	100%	0.0
51280..52380	ATPase [Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus]	100%	100%	0.0

1189 contig

CDS	BLAST	IDENTIDADE	COBERTURA	E-VALEU
262..570	MurG superfamily	90.20%	100%	3e-50
718..1410	MurG superfamily	100%	100%	1e-158
1407..2879	MurG superfamily	100%	100%	0.0
2876..3805	FtsQ superfamily	100%	100%	0.0
4096..5259	FtsZ superfamily	100%	100%	0.0

5283..5990	YggS family pyridoxal phosphate-dependent enzyme	100%	100%	2e-173
5990..6709	peptidoglycan editing factor PgeF	100%	100%	3e-164
6798..7439	cell division protein SepF	100%	100%	6e-147
complement (7512..8258)	DUF899 domain-containing protein	100%	100%	0.0
complement (8268..8612)	Transcriptional regulator, ArsR family	100%	100%	2e-75
complement (8609..9139)	activator of HSP90 ATPase	100%	73%	2e-91
9249..9575	YGGT family protein	98%	93%	3e-61
9805..10632	DivIVA domain-containing protein	100%	100%	0.0
11139..11735	M15 family metallopeptidase	100%	100%	4e-139
complement (11748..12722)	MBL fold metallo-hydrolase	100%	100%	0.0
complement (12724..13287)	carboxymuconolactone decarboxylase family protein	100%	100%	2e-132
13403..14011	TetR family transcriptional regulator	100%	100%	2e-142
15135..16253	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase II KasB	99.46%	100%	0.0
16383..17402	beta-ketoacyl synthase	100%	100%	0.0
17399..18688	3-oxoacyl-ACP synthase	100%	100%	0.0
18729..19976	Putative beta-ketoacyl synthase	100%	100%	0.0
20016..20786	3-oxoacyl-ACP reductase	100%	100%	0.0
20883..21632	thioesterase	100%	100%	2e-179
21639..22634	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	100%	100%	0.0
22809..23981	acyltransferase PapA5	100%	100%	0.0
23981..24439	membrane protein	100%	100%	5e-107

24464..27343	RND family transporter	100%	100%	0.0
27349..28608	MFS transporter	100%	100%	0.0
28592..29572	alpha/beta hydrolase	100%	100%	0.0
complement (29767..30345)	carboxymuconolactone decarboxylase family protein	100%	100%	2e-135
complement (30381..31481)	zinc-binding dehydrogenase	100%	100%	0.0
complement (31478..32977)	acetyl-CoA acetyltransferase	100%	100%	0.0
33023..33709	Transcriptional regulator, AcrR family	100%	100%	6e-160
33755..34192	Paal family thioesterase	100%	100%	2e-102
34192..35103	alpha/beta hydrolase	100%	100%	0.0
35176..35775	TetR family transcriptional regulator	100%	100%	5e-141
complement (35792..36991)	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	100%	100%	0.0
complement (36988..38376)	Putative cytochrome P450 hydroxylase	100%	100%	0.0
complement (38407..38727)	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain- containing protein	100%	100%	3e-75
38842..39846	Transcriptional regulator, AraC family	100%	100%	0.0
40127..41293	thiolase family protein	100%	100%	0.0
41290..41727	Zn-ribbon domain-containing OB-fold protein	100%	100%	2e-99
41724..42767	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	100%	100%	0.0
42760..43218	MaoC family dehydratase	100%	100%	5e-106
43215..43640	dihydroxy-acid dehydratase	100%	100%	3e-96
43637..44164	MaoC family dehydratase	100%	100%	0.0
44675..45442	enoyl-CoA hydratase	100%	100%	0.0

46722..47978	DUF1446 domain-containing protein	99.76%	100%	0.0
complement (47975..48568)	Transcriptional regulator, AcrR family	100%	100%	0.0
complement (48788..49645)	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	99.65%	100%	0.0
Complement (50367..51521)	Acyl-CoA dehydrogenase	100%	100%	0.0
complement (51576..52841)	acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit alpha	100%	100%	0.0
complement (52838..52963)	putative acetyl/propionyl carboxylase alpha subunit	100%	100%	3e-19
complement (53043..53609)	ATP-grasp domain-containing protein	98%	82%	4e-98
complement (53615..54748)	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit	99%	100%	0.0
complement (54718..55215)	carboxyl transferase	99.39%	100%	5e-117
complement (55559..56170)	TetR family transcriptional regulator	100%	100%	1e-145
56303..57172	metal-dependent hydrolase	100%	100%	0.0
complement (57354..57917)	transcriptional regulator, TetR family	100%	100%	1e-131
58238..58969	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	100%	100%	1e-177
59903..61396	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	100%	100%	0.0
61441..62958	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	100%	100%	0.0
62955..63920	alpha/beta hydrolase	100%	100%	0.0
63997..65496	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	100%	100%	0.0
65642..67099	Cytochrome P450	100%	100%	0.0
67096..67749	transglutaminase family protein	100%	100%	3e-160
67764..69395	fatty acid--CoA ligase	100%	100%	0.0
69434..70579	Acyl-CoA dehydrogenase	100%	100%	0.0

70629..71687	DUF4872 domain-containing protein	100%	100%	0.0
71779..72189	sterol carrier protein	100%	100%	2e-94
72338..73444	NDMA-dependent alcohol dehydrogenase	100%	100%	0.0
73605..74804	Acyl-CoA dehydrogenase	100%	100%	0.0
complement (74845..75285)	Mobile element protein	100%	100%	0.0
75357..75665	Mobile element protein	100%	100%	0.0
75698..76519	Integrase, catalytic region	100%	100%	0.0
78060..78785	nucleotidyltransferase AbiEii toxin of type IV toxin-antitoxin system	100%	100%	2e-171
78963..80078	Patatin-like protein	100%	100%	0.0
80065..81078	nucleotidyltransferase	100%	100%	0.0
81075..82850	thiamine biosynthesis protein ThiF	100%	100%	0.0
83516..83977	HD domain-containing protein	99.33%	98%	6e-101
complement (83986..84453)	NUDIX domain-containing protein	100%	100%	2e109
complement (84460..85428)	helix-turn-helix domain-containing protein	100%	100%	0.0
85951..87396	cell division protein FtsK	100%	100%	0.0
87389..88900	Putative plasmid replication initiator protein	100%	100%	0.0
92336..92857	YbhB/YbcL family Raf kinase inhibitor-like protein	100%	100%	5e-121
complement (92869..93930)	quinone-dependent dihydroorotate dehydrogenase	100%	100%	0.0
complement (93930..94190)	quinone-dependent dihydroorotate dehydrogenase	98.84%	100%	3e-53
95715..96545	undecaprenyl-diphosphate phosphatase	100%	100%	0.0
96542..97234	MSMEG_4193 family putative phosphomutase	100%	100%	1e-164

97254..97841	DUF3090 domain-containing protein	100%	100%	5e-138
97825..98643	SCO1664 family protein	100%	100%	0.0
99730..100062	DUF732 domain-containing protein	100%	100%	4e-73
complement (100066..100911)	LLM class flavin-dependent oxidoreductase	100%	100%	0.0
100967..101731	3'-phosphoadenosine 5'-phosphate phosphatase	99.61	100%	2e-178
101752..102990	cysteine--1-D-myo-inosityl 2-amino-2-deoxy- alpha-D-glucopyranoside ligase	100%	100%	0.0
103000..103881	SDR family oxidoreductase	100%	100%	0.0
complement (104362..107394)	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase	100%	100%	0.0
complement (107450..108775)	Polyketide synthetase MbtC	99.77%	100%	0.0
complement (108772..109536)	Surfactin synthase thioesterase subunit	100%	100%	0.0
109764..114791	non-ribosomal peptide synthetase	100%	100%	0.0
114788..119317	non-ribosomal peptide synthetase	100%	100%	0.0
119335..121275	non-ribosomal peptide synthetase	93%	100%	0.0
121298..122803	non-ribosomal peptide synthetase	99.80%	100%	0.0
complement (122808..124187)	SagB-type dehydrogenase domain	100%	100%	0.0
124463..125617	lactate 2-monooxygenase	100%	100%	0.0
complement (125699..126367)	trimeric intracellular cation channel family protein	99.55%	100%	2e-150
127543..131295	methionine synthase	99.92%	100%	0.0
131342..131905	HAD family phosphatase	100%	100%	4e-134