

CAROLINA SALGADO PEDACE

**Desenvolvimento de método rápido de detecção de gene de
resistência a claritromicina para o grupo *Mycobacterium*
abscessus por PCR em tempo real**

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

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Erica Chimara

SÃO PAULO

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Pedace, Carolina Salgado

Desenvolvimento de método rápido de detecção de gene de resistência a claritromicina para o grupo *Mycobacterium abscessus* por PCR em tempo real / Carolina Salgado Pedace. – 2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Erica Chimara.

1. Micobactérias não tuberculosas.
2. Farmacorresistência bacteriana.
3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.
4. Testes de sensibilidade microbiana.

SES/CCD/CD - 419/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Dedicatória

Aos meus pais, Nilton e Mirian, meus irmãos, João Pedro e Rodrigo, minhas avós, Nilse e Dilma e minha sobrinha Yasmin. Minhas inspirações.

Agradecimentos

A DEUS toda a honra e toda a glória. Agradeço primeiramente ter sido de Sua vontade que eu estivesse no mestrado. Agradeço pela saúde, sustento e força neste período.

Aos meus pais, Nilton e Mirian, e aos meus irmãos, Rodrigo e João Pedro, que me deram apoio, incentivo, amor, exemplo, cuidado, paciência e ajuda para esta realização.

A minha orientadora, Dra. Erica Chimara, pela oportunidade, confiança, paciência e por ter compartilhado seu conhecimento e experiência com valiosos ensinamentos acadêmicos e pessoais. Dedico-lhe este pensamento: **“Os grandes mestres não ensinam, e sim contagiam” (Perfeito Fortuna)**. De coração, obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e a todos os professores que foram importantes para esta formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de estudos.

Às minhas amigas e companheiras de trajetória Amanda Bertani, Mariana Bueno e Thays Barcellos pelos anos de amizade e apoio em todos os momentos. Às amigas companheiras nas disciplinas, Isadora Ribeiro, Erica Ori e Angela Brandão, agradeço pelo companheirismo, trabalhos, bom convívio e todos os momentos.

Ao meu companheiro Renan Augusto pelo apoio, força, compreensão, amor, carinho, paciência e prestígio.

Aos meus familiares e às minhas amigas de infância Miriã Foresto e Fernanda Leonardi que sempre torceram por esta realização.

Ao Centro de Bacteriologia e Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz, espaço em que realizei a parte prática. Agradeço aos colegas pelos anos de convívio e aprendizado que tive. Em especial, agradeço às meninas do NTM, Andreia Rodrigues, Fernanda Simeão e Natalia Fernandes pela ajuda prestada quando precisei.

Ao Dr. Claudio Sacchi e à Claudia Regina Gonçalves pelo sequenciamento de minhas placas, disponibilidade e prontidão.

À banca de avaliadores do exame de qualificação e defesa, Dr. Fernando Rogério Pavan, Dra. Regina Célia Moreira, Dr. Sidney Bombarda e Dr. Valdes Roberto Bollela pelas pertinentes sugestões e pelos bons e motivadores comentários.

Epígrafe

“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar” (Josué 1:9).

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

Pedace, C.S. Desenvolvimento de método rápido de detecção de gene de resistência a claritromicina para o grupo *Mycobacterium abscessus* por PCR em tempo real.

Resumo

O grupo *Mycobacterium abscessus* (MAG) é a principal causa de infecções pulmonares e extrapulmonares entre as micobactérias de crescimento rápido. Para determinar a resistência à claritromicina (CLA), o método de concentração inibitória mínima (CIM) é realizado, no entanto, as leituras são feitas após três e 14 dias de incubação para detectar a resistência induzida (RI). A suscetibilidade a CLA é detectada pela deleção ou polimorfismo no gene *erm*(41). Quando o genótipo é selvagem (T28), a RI à claritromicina é verificada, enquanto para C28 não é observada. O presente estudo tem como objetivo padronizar um ensaio Taqman de PCR em tempo real (qPCR) para detecção do polimorfismo T28C e compará-lo aos resultados obtidos do sequenciamento do gene *erm*(41). O total de 207 isolados de MAG que preencheram os critérios bacteriológicos da American Thoracic Society, foi recebido no IAL entre 2010 e 2012. Os isolados foram identificados pelo método PRA-*hsp65* como *M. abscessus* tipo 1 (n=135, 65,2%) e *M. abscessus* tipo 2 (n=72, 34,8%) e submetidos ao CIM para CLA com leitura nos dias três e 14. A PCR convencional foi utilizada para detecção da deleção; o sequenciamento do gene *erm*(41) foi realizado para detectar a mutação T28C; o sequenciamento dos genes *rpoB* e *hsp65* foram utilizados para identificação das subespécies e o sequenciamento do gene *rrl* foi feito para detecção da mutação A2058G (resistência adquirida). A sequência de MAG EU590129 foi submetida ao Centro de Treinamento da empresa Thermo Fisher Scientific, a qual customizou o ensaio e forneceu os parâmetros de corrida. Dos 207 isolados, 33 eram *M. a. massiliense*, 136 *M. a. abscessus* e 38 *M. a. boletii* pelo sequenciamento do gene *rpoB*, que apresentou sete (3,38%) isolados discordantes em relação ao sequenciamento do gene *hsp65*. Nenhum isolado apresentou mutação no gene *rrl*. No sequenciamento de *erm*(41), 197 isolados foram T28 e 10 C28, assim como na qPCR. Na comparação dos perfis genéticos com o perfil de suscetibilidade foram encontrados 10 isolados com resultados discordantes (4,8%), sendo nove isolados sensíveis com gene *erm*(41) selvagem e um isolado com deleção em *erm*(41) apresentando RI. A concordância da qPCR com o sequenciamento do gene *erm*(41) foi de 100%. A sensibilidade e especificidade de qPCR foi de 100%. A qPCR apresenta menor tempo de reação, menor chance de erro e contaminação e possui fácil interpretação dos resultados, diminuindo à espera do diagnóstico pelo médico e paciente.

Palavras-chave: micobactérias não tuberculosas, farmacorresistência bacteriana, PCR em tempo real, testes de sensibilidade bacteriana.

Pedace, C. S. Development of a rapid method for the detection of the clarithromycin resistance gene for the *Mycobacterium abscessus* group by real-time PCR.

Abstract

The *Mycobacterium abscessus* (MAG) group is the main cause of pulmonary and extrapulmonary infections among fast-growing mycobacteria. To determine resistance to clarithromycin (CLA), the minimum inhibitory concentration (MIC) method is performed, however, readings are taken after three and 14 days of incubation to detect induced resistance (IR). Susceptibility to CLA is detected by deletion or polymorphism in the *erm* (41) gene. When the genotype is wild (T28), clarithromycin IR is checked, while for C28 it is not observed. The present study aims to standardize a SNP Taqman real-time PCR (qPCR) assay for the detection of the T28C polymorphism and compare it to the results obtained from the sequencing of the *erm*(41) gene. A total of 207 MAG isolates that met the bacteriological criteria of the American Thoracic Society, were received at the IAL between 2010 and 2012. The isolates were identified by the PRA-*hsp65* method as *M. abscessus* type 1 (n=135, 65.2%) or *M. abscessus* type 2 (n=72, 34.8%) and submitted to CIM for CLA with reading on days three and 14. Conventional PCR was used to detect the deletion; sequencing of the *erm* (41) gene was performed to detect the T28C mutation; the sequencing of the *rpoB* and *hsp65* genes were used to identify the subspecies and the sequencing of the *rrl* gene was done to detect the A2058G mutation (acquired resistance). The sequence of MAG EU590129 was submitted to the Training Center of the company Thermo Fisher Scientific, which customized the test and provided the running parameters. Of the 207 isolates, 33 were *M. a. massiliense*, 136 *M. a. abscessus* and 38 *M. a. boletii* by sequencing the *rpoB* gene, that demonstrated discrepancy between seven isolates (3.38%) compared to sequencing the *hsp65* gene. No isolate showed a mutation in the *rrl* gene. In the *erm*(41) sequencing, 197 isolates were T28 and 10 C28, as well as in qPCR. When comparing the genetic profiles with the susceptibility profile, 10 isolates were found with discordant results (4.8%), with nine sensitive isolates with wild *erm*(41) gene and an isolate with *erm*(41) deletion presenting IR. The qPCR agreement with the sequencing of the *erm* (41) gene was 100%. The sensitivity and specificity of qPCR was 100%. QPCR has less reaction time, less chance of error and contamination and has easy interpretation of results, decreasing waiting for diagnosis by doctor and patient.

Keywords: non-tuberculous mycobacteria, antibacterial drug resistance, real-time PCR, bacterial sensitivity tests.

Lista de abreviaturas e siglas

AAI	Identidade média de aminoácidos em pares
Arg	Aminoácido arginina
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	Sociedade Torácica Americana
BAAR	Bácilos álcool-ácido resistentes
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BTS	Sociedade Torácica Britânica
CC	Controle do crescimento
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CM	Controle do meio
CSI	Indels de assinatura conservada
CSPs	Proteínas assinadas conservadas
CT	Cycle threshold
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>erm</i>	metilase resistente a eritromicina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ITS	Região espaçadora transcrita interna
I.V	Intravenoso
KCTC	Korean Collection for Type Cultures
LJ	Lowenstein Jensen
LMD	Limite mínimo de detecção
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature

MABSC	Grupo <i>M. abscessus</i>
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight
MCL	Micobactéria de crescimento lento
MCR	Micobactéria de crescimento rápido
MFC	Complexo <i>Mycobacterium fortuitum</i>
MHC	Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
MOTT	Mycobacteria other than tubercle bacilli
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NTM	Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PMNT	Infecções pulmonares por MNT
PRA	PCR e análise de restrição
qPCR	Real Time Quantitative PCR
R	Resistente
REMA	Resazurin Microtiter Assay
R.I	Resistente induzido
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
S	Sensível
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TB	Tuberculose
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TET	Tampão Tris/EDTA/Triton
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
Trp	Aminoácido triptofano
TSA	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
WHO	World Health Organization

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação das micobactérias segundo Runyon (1959).....	21
Figura 2. Variação no grau de patogenicidade das espécies de micobactérias mais frequentemente isoladas de amostras clínicas.....	22
Figura 3. Linha do tempo da classificação taxonômica do grupo <i>M. abscessus</i> desde seu primeiro isolamento até os dias atuais.....	35
Figura 4. Fluxograma do regime terapêutico para doença pulmonar pelo grupo <i>M. abscessus</i> baseada em resultados laboratoriais de suscetibilidade aos fármacos e recomendada pela Sociedade Torácica Britânica.....	48
Figura 5. Regime terapêutico recomendado pelo CVE para doença pulmonar por <i>M. abscessus</i>	49
Figura 6. Mecanismos de resistência exibidos por <i>M. abscessus</i>	51
Figura 7. Mecanismo de ação dos macrolídeos e resistência induzida. (A) Os macrolídeos ligam-se ao RNA ribossomômico 23S, impedindo a síntese proteica bacteriana. A expressão das proteínas <i>erm</i> (metilases de resistência à eritromicina, demonstradas como “M”) em resposta aos macrolídeos conduz à modificação do seu local de ligação ribossômica e à indução de resistência aos macrolídeos. (B) Nenhum macrolídeo pode induzir resistência em <i>M. a. massiliense</i> por ser portador de um gene <i>erm</i> (41) disfuncional.....	54

Figura 8. Produtos de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *massiliense* amplificados do gene *erm* (41) por PCR convencional (Kim et al., 2010). As amplificações de DNA do gene *erm*(41) de *M. abscesuss subsp. massiliense* tanto da cepa de referência KCTC 19086 como dos isolados 133, 134, e 140 são menores (397 bp) do que as amplificações de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 e dos isolados 135, 138, e 141, bem como de *M. bolletii* KCTC 19281 e do isolado 194 (673 pb). M, marcador de DNA de 100 pb; NC, controle negativo.....**60**

Figura 9. Esquema representativo da organização das placas de CIM e as concentrações finais de claritromicina em cada orifício em µg/ml. CC= controle de crescimento (controle positivo); CM= controle de meio (controle negativo)..**69**

Figura 10. Esquema representativo das diluições seriadas no fator 10.....**76**

Figura 11. Captura de tela da amplificação gerada no software do equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™). O sinal em azul é representativo da fluorescência por FAM, utilizada para detecção de T28. A curva é observada em “Multicomponent Plot”, no qual, a cepa ATCC 19977 foi utilizada em duplicata como controle positivo para o alelo T28 nos orifícios A1 e B1 da placa de 96 poços.....**83**

Figura 12. Captura de tela da amplificação gerada no software do equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™). O sinal em verde é representativo da fluorescência por VIC, utilizada para detecção de C28. A curva é observada em “Multicomponent Plot”, no qual, o isolado 2567 do ano de 2011, conhecido como portador do alelo C28 pelo sequenciamento do gene *erm* (41) foi utilizado em duplicata como controle positivo para o alelo C28 nos orifícios C1 e D1 da placa de 96 poços.....**84**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos em todas as técnicas realizadas no estudo.....**79**

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade a claritromicina após três dias de incubação, conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.....**81**

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade a claritromicina após 14 dias de incubação, conforme espécie identificada pelo sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*.....**82**

Lista de Quadros

Quadro 1. Critérios clínicos e microbiológicos para o diagnóstico de doença pulmonar por <i>M. abscessus</i> (e MNT de maneira geral) baseados em um documento oficial da ATS (2007).....	41
Quadro 2. Regime de tratamento para infecção por <i>M. abscessus</i> adaptado de Ruvandhi et al., 2019.....	46
Quadro 3. Correlação entre os perfis genéticos conhecidos atualmente dos genes <i>rrl</i> e <i>erm</i> (41) do grupo <i>M. abscessus</i> e o perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> à claritromicina.....	55
Quadro 4. Esquema de concentrações obtidas na diluição seriada e concentrações finais adicionadas na reação de qPCR para avaliação do LMD.....	76

Índice

1. Introdução.....	18
1.1 Gênero <i>Mycobacterium</i>	18
1.2 Identificação de micobactérias.....	22
1.3 Micobactérias não tuberculosas (MNT).....	27
1.4 Micobactérias de crescimento rápido (MCR).....	29
1.5 Grupo <i>Mycobacterium abscessus</i>	31
1.5.1 Taxonomia.....	32
1.5.2 Epidemiologia.....	38
1.5.3 Critérios diagnósticos.....	40
1.5.4 Apresentações clínicas mais importantes.....	42
1.5.5 Tratamento.....	43
1.5.6 Mecanismos de resistência aos macrolídeos.....	50
1.5.7 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	57
1.5.8 Detecção genotípica da resistência por PCR convencional.....	59
1.5.9 PCR em tempo real (qPCR).....	61
2. Objetivo.....	63
2.1 Objetivo Geral.....	63
2.2 Objetivos Específicos.....	63
3. Material e Métodos.....	65
3.1 Isolados estudados.....	65
3.2 Manutenção dos isolados.....	65
3.3 Extração de DNA.....	65
3.4 PCR convencional.....	66
3.5 Teste de suscetibilidade fenotípico a claritromicina.....	67
3.6 Sequenciamento do gene <i>rpoB</i>	69

3.7 Sequenciamento do gene <i>rrl</i>.....	72
3.8 Sequenciamento do gene <i>erm</i>(41).....	73
3.9 Sequenciamento do gene <i>hsp</i>65.....	73
3.10 PCR em tempo real.....	74
4. Resultados.....	78
4.1 Isolados.....	78
4.2 Identificação de subespécies.....	78
4.3 Sequenciamento dos genes <i>erm</i>(41) e <i>rrl</i>.....	79
4.4 Teste de suscetibilidade fenotípico a claritromicina.....	81
4.5 PCR em tempo real.....	83
5. Discussão.....	87
6. Conclusões.....	93
7. Referências bibliográficas.....	94

1. Introdução

1.1 Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é composto por microrganismos das espécies *Mycobacterium leprae*, complexo *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies denominadas micobactérias não tuberculosas (O'Neill et al., 2015).

Historicamente, Robert Koch observou que o bacilo da hanseníase (*Mycobacterium leprae*) tinha as mesmas características de coloração do bacilo da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), mas somente alguns anos depois elas foram agrupadas no mesmo gênero por Lehmann e Neumann em 1896, os quais estabeleceram e comprovaram que as duas espécies possuíam as mesmas características morfológicas e tintoriais: bacilos finos, com alguma ramificação, resistentes a álcool ácido, com colônias secas e enrugadas em ágar (Conn, 1947). Robert Koch também descreveu outras espécies de micobactérias que não pertenciam ao *M. leprae* e nem ao complexo *M. tuberculosis*, as quais foram então denominadas micobactérias atípicas e receberam várias denominações, como, ambientais, oportunistas e micobactérias que não o bacilo da tuberculose (*Mycobacteria other than tubercle bacilli*- MOTT). Atualmente a comunidade científica aceita a nomenclatura micobactérias não tuberculosas, MNT (Wayne et al., 1969; Falkinham III, 1996).

As micobactérias pertencem ao domínio Bacteria, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae e família Mycobacteriaceae, a qual possui apenas um gênero denominado *Mycobacterium* (*fungus bacterium*), nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referência à película formada pelo *M. tuberculosis* na superfície de meios líquidos, que era similar a película produzida por alguns fungos (Collins et al. 1997). As espécies desse gênero são definidas por bacilos com morfologia nas dimensões de 0,2 a 0,7 por 1,0 a 10 micrômetros, imóveis, levemente curvas (ou algumas vezes retas)

finas, aeróbias, não formadoras de esporos e sem cápsula. A parede celular desses microrganismos é rica em lipídios, entre eles os característicos ácidos micólicos, que conferem resistência a soluções álcool-ácidas e podem ser usados para a identificação de espécies micobacterianas (Brasil, 2008; Euzéby, 2019).

A membrana plasmática possui uma estrutura básica que não difere de outras bactérias: lipídios polares, principalmente fosfolipídios agrupados, em associação com proteínas, formando uma bicamada lipídica (Daffé e Draper, 1998). A parede celular das micobactérias possui uma conformação única, constituída por quatro camadas que diferem entre si em composição, localização e função. A camada mais interna é formada por peptideoglicano (mureína) e confere resistência aos microrganismos, formado por ácido N-glicolilmurâmico (Brito, 2008). A segunda camada é composta por arabinogalactano, ligado ao peptideoglicano por ligações fosfodiéster. A camada seguinte representa cerca de 60% do peso seco da parede celular micobacteriana, formada por ácidos micólicos. Estes são lipídeos constituídos por ácidos graxos de cadeias longas com 60 a 90 átomos de carbono e conferem resistência à dessecação, permitindo a sobrevivência por períodos prolongados em condições desfavoráveis (Daffé e Draper, 1998). Este alto conteúdo lipídico é considerado o principal fator que contribui para a baixa permeabilidade e resistência aos fármacos (Brennan e Nikaido, 1995), além disso, são responsáveis também pela característica tintorial das micobactérias na coloração de Ziehl Neelsen, resistindo à descoloração por álcool-ácido. A última camada, e mais externa, é composta por diferentes tipos de lipídeos, dentre eles: glicolipídeos, sulfolipídeos, fenolglicolipídeos, peptídeglicolipídeos e lipoarabinomanano (Daffé e Draper, 1998).

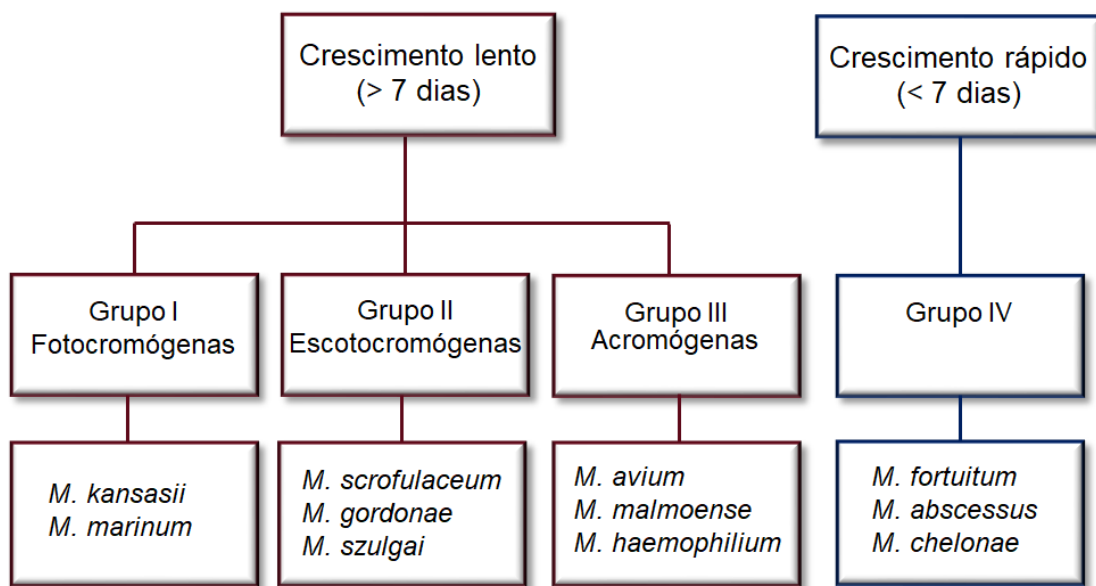
As micobactérias apresentam crescimento mais lento que a maioria das outras bactérias que causam infecção nos seres humanos. Esta lentidão parece estar relacionada à absorção mais demorada de nutrientes, provavelmente devido à grande quantidade de lipídeos da parede celular (Isenberg, 1992).

Estes microrganismos são classificados de patogênicos a saprófitos, podendo ser isolados de amostras clínicas, de água, solo, de outras fontes ambientais, objetos, alimentos e também em material médico (endoscópios e soluções cirúrgicas) (Leão et al., 2005).

Segundo o sistema de classificação de Runyon (1959) (Figura 1), as micobactérias podem ser classificadas de acordo com o tempo de crescimento em micobactérias de crescimento rápido (MCR), caracterizadas pela formação de colônias visíveis a olho nu em culturas de meio sólido em até sete dias (Metchock et al., 1999) e aquelas de crescimento lento (MCL), que o fazem após sete dias de incubação (Herrera-León et al., 2009).

A classificação descrita por Runyon, e que ainda é muito utilizada nos laboratórios para a identificação das espécies, estabelece quatro grupos, a saber: três de crescimento lento (Grupos I, II e III) e um de crescimento rápido (Grupo IV) (Figura 1).

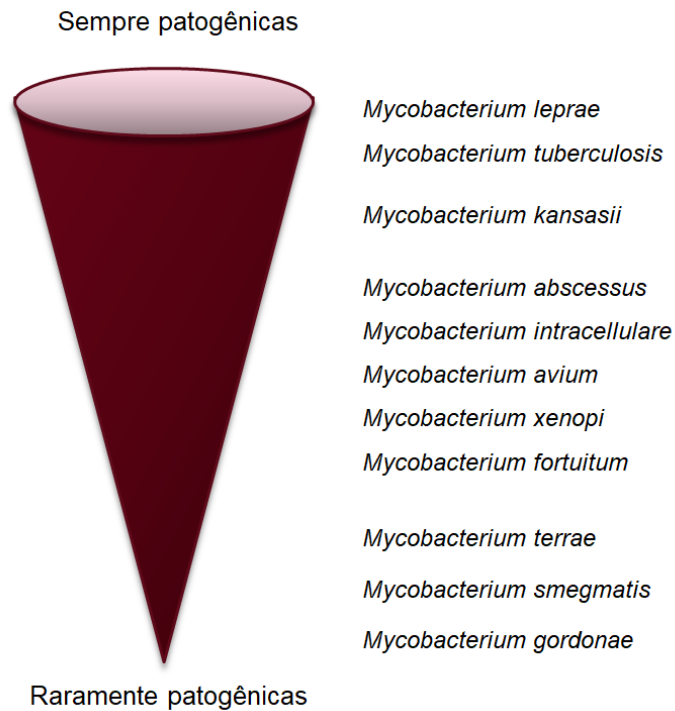
O Grupo I engloba as micobactérias fotocromógenas, que produzem pigmento somente após a exposição à luz. São exemplos deste grupo *M. kansasii* e *M. marinum*. No Grupo II, encontram-se as micobactérias escotocromógenas, que produzem pigmento tanto na presença quanto na ausência de luz, como *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* e *M. szulgai*. No Grupo III, estão as micobactérias não cromógenas ou acromógenas, que além de não produzirem pigmento, geralmente apresentam crescimento extremamente lento, como *M. avium*, *M. malmoense* e *M. haemophilium*. Essas MNT apresentam características semelhantes ao complexo *M. tuberculosis*, que também apresenta crescimento mais lento. O Grupo IV abrange as MCR, suas colônias são geralmente lisas e podem ser pigmentadas, como *M. vaccae* e *M. parafortuitum*, ou não pigmentadas, como *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae* (Jarzembowski e Young, 2008).



Fonte: Adaptado de Riello, 2015

Figura 1. Classificação das micobactérias segundo Runyon (1959).

Em relação à patogenicidade, as micobactérias podem ser classificadas em patogênicas, potencialmente patogênicas e raramente patogênicas. As micobactérias classificadas como patogênicas incluem *M. leprae* e todo o complexo *M. tuberculosis*. Entre as micobactérias potencialmente patogênicas, são encontradas as espécies de MNT: *M. kansasii*, *M. avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, grupo *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. celatum*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. branderi*, *M. asiaticum*, *M. haemophilum*, e *M. simiae*. Entre as raramente patogênicas estão *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. porcinum*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, entre outras (Figura 2). Quando responsáveis por processos patológicos em humanos, as MNT podem acometer qualquer tecido dos sistemas ou disseminar-se por todo o organismo, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A doença que ocasionam é denominada de micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia (BRASIL, 2008a).



Fonte: Adaptado de Weiss et al., 2012.

Figura 2. Variação no grau de patogenicidade das espécies de micobactérias mais frequentemente isoladas de amostras clínicas.

1.2 Identificação de micobactérias

Embora classificadas como bactérias Gram-positivas, as micobactérias apresentam coloração variável pelo método de Gram. Para a sua coloração são utilizadas, geralmente, as técnicas de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun. Ambas utilizam fucsina, que confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem à descoloração após lavagem com solução álcool-ácido, receberam a designação de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (Rosemberg e Tarantino, 2002).

A baciloscopia ainda é o teste mais utilizado para o diagnóstico de micobactérias (Rocchetti et al., 2017), embora seja bem conhecido que a sensibilidade deste teste pode variar de 20% a 80% (Behr et al., 1999).

A cultura é um teste mais sensível para a detecção de micobactérias, pois apenas algumas células de micobactérias por mL de amostra são necessárias para o crescimento.

A identificação fenotípica de espécies micobacterianas baseia-se no crescimento *in vitro*, morfologia da colônia, produção de pigmento e perfil bioquímico demonstrado por meio das atividades metabólicas. Além de serem testes muito trabalhosos, os resultados são obtidos após 15 dias de incubação e, para muitas espécies de MNT, os testes podem ser pouco reprodutíveis e consequentemente as interpretações podem ser ambíguas ou errôneas (Springer et al., 1996; Gholoobi et al., 2014).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também tem sido utilizada para identificação de micobactérias pela obtenção dos padrões de ácidos micólicos. No entanto, este método não é utilizado uma vez que as MCR apresentam perfis de ácidos micólicos muito semelhantes (Wilson et al., 2001).

Na última década, a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF vem se tornando uma ferramenta confiável para identificação de MNT, devido a vários métodos de extração disponíveis, que aumentam a qualidade das proteínas bacterianas obtidas para a identificação no equipamento, além do número crescente de espectros de micobactérias armazenados em bancos de dados comerciais. A bioMérieux padronizou um pré tratamento para o gênero *Mycobacterium* e *Nocardia* com seus kits de reagentes, melhorando o processamento das amostras e desempenho na identificação (Alcaide et al., 2018). É importante ressaltar que nas análises de MALDI-TOF as espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* são identificadas apenas em nível de complexo (Alcaide et al., 2018).

O método mais amplamente utilizado por laboratórios de referência e pesquisa para a identificação molecular de micobactérias é a análise dos

polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *hsp65*, técnica denominada PRA, do inglês *PCR restriction analysis* (Devallois et al., 1997). O gene *hsp65* é responsável por codificar uma proteína de choque térmico de 65kDa, a qual é sintetizada em situações de stress térmico, do inglês *heat shock protein* (Telenti et al., 1993). Esta técnica é baseada em uma PCR que amplifica um fragmento de 441pb do gene *hsp65*, seguida de uma digestão com enzimas de restrição e posterior análise dos fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose. As espécies de micobactérias apresentam padrões de fragmentos de restrições distintos, de modo que a identificação da espécie seja determinada pela comparação com algoritmos publicados (Chimara et al., 2008). No entanto, diferentes espécies podem apresentar perfis idênticos, impossibilitando a identificação de algumas espécies (Chimara et al., 2008).

Com a necessidade cada vez mais crescente de rapidez e acurácia na detecção e identificação das MNT, muitos métodos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção precoce de micobactérias em amostras clínicas, como os kits comerciais de detecção por hibridação reversa (Richter et al., 2006; Eliseev et al., 2019) e a PCR em tempo real (Pinhata et al., 2015).

Para a identificação das espécies micobacterianas estão disponíveis testes comerciais que utilizam sondas, como AccuProbe (Gen-Probe Incorporated, San Diego, Califórnia) e ensaios que também utilizam sondas imobilizadas como INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics NV, Ghent, Bélgica), Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell, Santa Fé, Granada, Espanha) e GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha). Estes três últimos são baseados na hibridação reversa de um produto de PCR em uma tira de nitrocelulose com sondas imobilizadas que diferenciam várias espécies micobacterianas (Richter et al., 2006; Hoffman-Thiel et al., 2011).

O teste Speed-oligo® Mycobacteria utiliza uma PCR da sequência espaçadora dos genes 16S-23S, chamada ITS (região espaçadora transcrita interna, do inglês *Internal Transcribed Spacer*) seguida de hibridação com sondas imobilizadas por meio de uma técnica simples e rápida de imersão da

fita diretamente no produto de PCR (Hofmann-Thiel et al., 2011). O teste detecta o complexo *M. tuberculosis* e mais 13 espécies de MNT (Quezel-Guerraz et al., 2010).

O teste INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 também tem como alvo a região espaçadora do gene 16S-23S rRNA e fornece a identificação de 16 espécies diferentes (Makinen et al., 2002), enquanto o teste GenoType Mycobacterium tem como alvo um fragmento do gene 23S rRNA e fornece a identificação simultânea de 13 espécies de micobactérias (Scarparo et al., 2001; Padilla et al., 2004; Sarkola et al., 2004)

Com o propósito de ampliar a faixa de detecção das espécies micobacterianas, foi desenvolvida outra versão do ensaio GenoType Mycobacteria utilizando-se do mesmo alvo. A nova versão contém ensaios combinados de GenoType Mycobacterium CM / AS (CM, micobactéria comum; AS, espécies adicionais), que são executados consecutivamente e destinam-se à identificação de 23 e 14 espécies de micobactérias, respectivamente (Richter et al., 2006; Sebastian et al., 2018).

No entanto, uma limitação destes testes é a resolução de padrões que representam mais de uma espécie, o que requer outras técnicas para maior discriminação, como acontece com *M. abscessus*, que é detectado pelo mesmo padrão que *M. immunogenum* na fita GenoType (Richter et al., 2006) e entre *M. farcinogenes* com *M. fortuitum* no teste Speed-oligo Mycobacteria (Vircel, S.L. edição 2016/07).

Uma nova versão da Hain Lifescience, o GenoType NTM-DR, além de identificar as espécies do complexo *M. avium* (*M. avium*, *M. intracellulare* e *M. chimaera*), *M. chelonae* e grupo *M. abscessus*, detecta mecanismos de resistência naturais e adquiridos para macrolídeos e aminoglicosídeos (Mougari et al., 2017). Apesar de apresentar bons resultados, o teste que obteve registro na agência reguladora brasileira em 2019, ainda possui alto custo e apresenta como limitação a necessidade de equipamento específico para revelação dos padrões.

O sequenciamento de fragmentos de genes constitutivos é considerado o padrão ouro na identificação de micobactérias. A análise do gene da subunidade ribossomal 16S rRNA é amplamente aplicada para caracterização de espécies. Este gene altamente conservado consiste em uma sequência de aproximadamente 1.500 pares de base, na qual existem regiões comuns a todos os seres vivos, enquanto as variações de nucleotídeos estão concentradas em áreas específicas. No caso das micobactérias, as regiões hipervariáveis concentram-se no primeiro terço, que pode ser dividido em dois trechos: Região hipervariável A e B (posições 130-210 e 430-500, respectivamente, referente ao genoma de *Escherichia coli*) sendo que a região A pode ser utilizada suficientemente para identificação, enquanto a B pode ser considerada confirmatória (Tortoli et al., 2003).

Da mesma forma que o 16S rRNA, outro alvo de escolha para finalidade taxonômica é o gene *hsp65*. Este gene possui aproximadamente 1.623 pares de base, mas na distinção de espécies micobacterianas é utilizada a sequência variável de 441 pb (McNabb et al., 2004). Um estudo mostrou que um fragmento de 604 pares de base de *hsp65* também possui divergências de sequência suficientes para ser aplicado na identificação de espécies de isolados clínicos de micobactérias como marcador molecular alternativo (Kim et al., 2005).

O sequenciamento do gene *rpoB* tem sido recomendado para diferenciação de espécies micobacterianas (CLSI, 2018). Este gene tem o seu uso indicado para discriminação de espécies altamente relacionadas (Kim et al., 1999) e foi observado que suas sequências são mais variáveis que as do gene 16S rRNA nas MCR (Adekambi et al., 2003). Contudo, apesar de estes testes moleculares serem considerados padrão ouro para identificação de MCR, necessitam de pessoas altamente treinadas para sua execução e interpretação (Set, 2011).

Nos últimos anos, os sistemas de PCR em tempo real têm sido cada vez mais utilizados em laboratórios de micobacteriologia de rotina. A técnica permite

o monitoramento em tempo real de uma região de amplificação de DNA medindo um sinal de fluorescência acumulativo. A PCR em tempo real possui alta sensibilidade e especificidade (Ruiz et al., 2004), reduzindo o tempo de resposta e evitando o uso de géis corados com brometo de etídio (Neonakis et al., 2008). Os testes de PCR em tempo real multiplex permitem a detecção rápida e eficiente de mais de um alvo e representam uma alternativa confiável para o diagnóstico de coinfeções por micobactérias (Sharma et al., 2012).

1.3 Micobactérias não tuberculosas (MNT)

As MNT são patógenos oportunistas que causam infecções pulmonares e extrapulmonares, principalmente no contexto de doença subjacente (como doenças pulmonares inflamatórias, entre elas fibrose cística, bronquiectasia não fibrótica e doença pulmonar obstrutiva crônica) ou procedimentos iatrogênicos (Griffith et al., 2007; Scott-Lang et al., 2014; Baruque et al., 2015; Prevots e Marras, 2015), bem como em determinados indivíduos sem fatores de risco definíveis e evoluem para doença pulmonar crônica (Iseman e Marras, 2008; Chan et al., 2010). Embora a infecção grave possa afetar os gânglios linfáticos, pele, partes moles, ossos e articulações, a maioria das doenças é pulmonar (Tortoli, 2009).

As infecções por MNT estão aumentando e têm sido cada vez mais reconhecidas como uma importante causa de morbidade, especialmente em pacientes com fibrose cística e em populações imunossuprimidas e envelhecidas (Degiacomi et al., 2019).

Aproximadamente 200 espécies de MNT já foram identificadas (LPSN, 2019). Embora cerca de 80% das infecções pulmonares de MNT (PMNT) nos Estados Unidos estejam associadas ao complexo *M. avium*, a prevalência varia conforme a região geográfica (Prevots et al., 2010).

Estudos realizados nos Estados Unidos sugerem que a prevalência de PMNT está aumentando, especialmente entre adultos com idade maior ou igual

a 60 anos (Billinger et al., 2009; Prevots et al., 2010). As mulheres apresentam uma carga desproporcional de doença PMNT (Bodle et al., 2008; Prevots et al., 2010), como mostra um estudo que identifica fatores de risco para PMNT entre essa população (Kim et al., 2008). Contudo, embora o aumento do risco da doença PMNT entre os adultos mais velhos esteja bem estabelecido, as estimativas de prevalência da doença variam amplamente de acordo com a região geográfica (Adjemian et al., 2012).

As MNT são onipresentes no meio ambiente e são frequentemente detectadas em amostras de solo e água (Griffith & Aksamit 2016). Estes organismos são propensos à formação de biofilme, o que contribui para a sua capacidade de persistir em ambientes desfavoráveis (Johnson, 2008).

Ambientes próximos a população humana também são reservatórios para as MNT, como por exemplo, abastecimento de água, suprimentos de água hospitalar (pias, chuveiros) e de residências e, diferente dos outros microrganismos, as MNT são capazes de sobreviver em ambientes carentes de nutrientes, como água com cloro (McGrath et al., 2010)

Em 2009, Feazel e col. demonstraram que os chuveiros fornecem um ambiente enriquecido para a formação de biofilme por MNT. Outro estudo, no Havaí, investigou a prevalência de MNT no encanamento doméstico: áreas como chuveiros, pias, torneiras e bebedouros de geladeira foram amostradas. Os autores relataram que 69% dos domicílios pesquisados possuíam uma colonização significativa por MNT, das quais 10% pertenciam ao grupo *M. abscessus* (Honda et al., 2016).

Embora a transmissão de MNT pessoa a pessoa não tenha sido definitivamente estabelecida, Bryant e col. (2013) relatam esse evento entre pacientes internados com fibrose cística.

A maioria das infecções por MNT não pode ser tratada da mesma forma que a tuberculose porque as MNT possuem mecanismos naturais de resistência aos principais agentes antimicrobianos de primeira linha (e alguns de segunda linha) utilizados no tratamento da TB (van Ingen et al., 2012). Este perfil de

resistência é específico para cada espécie e a identificação das espécies deve preceder a escolha do tratamento (Brown-Elliott e Wallace, 2002).

1. 4 Micobactérias de crescimento rápido (MCR)

O grupo das MCR contempla quase 100 espécies de micobactérias. No entanto, os patógenos mais comuns pertencem ao Grupo *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *massiliense*), *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium immunogenum*, *Mycobacterium salmoniphilum* e Complexo *Mycobacterium fortuitum* (MFC) (Whipps et al., 2007; Leao et al., 2009; Prevots et al., 2010; O'Neill et al., 2015;). Destes, o grupo *M. abscessus* é o mais resistente a antibióticos e desinfetantes (Nash et al., 2009). Por esse motivo, as diretrizes para o diagnóstico e tratamento de MNT recomendam a rápida identificação deste grupo em nível de espécie (O'Neill et al., 2015).

A incidência das MCR como causadoras de infecções humanas aumentou nos últimos anos (Falkinham, 2009). Essa incidência de infecções tem sido associada a procedimentos cirúrgicos, principalmente em pacientes imunocomprometidos e juntamente com o surgimento de micobactérias resistentes a múltiplos fármacos, aumentou significativamente a demanda por uma rápida identificação desses microrganismos em laboratório clínico (Wongkitisophon et al., 2011; Nessar et al., 2012).

As MCR compreendem 56 espécies ambientais. Quinze espécies são comumente encontradas em humanos e animais (Lopez-Marin et al., 1993; Brown-Elliott e Wallace, 2002) as quais pertencem primeiramente aos grupos *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis* (Brown-Elliott e Wallace, 2002), que são os grupos de MCR mais frequentemente isolados em laboratórios de microbiologia clínica (Wallace et al., 1991; Wallace et al., 1993; Yakus et al., 2001). Há relatos destes principais grupos como responsáveis por pseudo-surtos de septicemia associada aos cuidados da assistência à saúde e

doença pulmonar após broncoscopia (Ashford et al., 1997; Lai et al., 1998; Wallace et al., 1998; Analssie et al., 2002), assim como em infecções de pele e de tecidos moles caracterizadas por inflamação granulomatosa lentamente progressiva, linfadenites, infecção disseminada e doença pulmonar crônica (Bonicke, 1966; Wallace et al., 1992; Wolinsky, 1992; Ingram et al., 1993; Wallace et al., 1998; Hogg et al., 1999; Brown-Elliott e Wallace, 2002).

Surtos de infecção cutânea por *M. chelonae* adquiridos após lipoaspiração (Meyers et al., 2002), furúnculos causados por *M. fortuitum* após escalda pés em salão de beleza (Winthrop et al., 2002), pneumonite por hipersensibilidade causados por *M. immunogenum* em trabalhadores de produção de automóveis expostos a fluidos metalúrgicos (Wilson et al., 2001; Wallace et al., 2002) e até mesmo abscessos mamários por *M. abscessus* após piercing no corpo (Trupiano et al., 2001) foram relatados.

As MCR também são responsáveis pela colonização das vias aéreas (Burns et al. 1991; Domenech et al., 1997), sendo difícil distinguir entre colonização e doença quando os isolados são obtidos de espécimes clínicos, especialmente do escarro (Cullen et al., 2000). Por isso, a Sociedade Torácica Americana (ATS) estabeleceu como doença o isolamento consecutivo da mesma espécie micobacteriana em duas amostras provenientes de sítios não estéreis ou então um isolamento de micobactéria em sítio estéril (ATS, 2007) além de sintomas característicos, radiologia compatível e exclusão de outras possíveis causas de doença pulmonar (Haworth et al., 2017).

Para o diagnóstico laboratorial, a Sociedade Torácica Britânica (BTS) recomenda que os isolados sejam obtidos de amostras de escarro, e se isso não for possível, como é o caso de crianças e idosos, amostras de lavado broncoalveolar e biópsia devem ser colhidas quando suspeitar de doença pulmonar por MNT (Haworth et al., 2017).

Quando necessário, o tratamento antibiótico não pode ser escolhido baseado apenas na identificação em nível de grupo (Wallace et al., 1998; Yakus et al., 2001; Brown-Elliott e Wallace, 2002). A identificação em nível de

espécie faz-se importante, pois fornece a primeira indicação em relação à suscetibilidade a antibióticos (Adekambi et al., 2003). No entanto, a identificação precisa de MCR em laboratórios é limitada, não chegando muitas vezes em nível de espécie (Adekambi et al., 2003).

1.5 Grupo *Mycobacterium abscessus*

O grupo *M. abscessus* foi descrito pela primeira vez por Moore e Frerichs em 1953 (Nessar 2012 *apud* Moore e Frerichs, 1953). No entanto, somente em 1992, após sua separação do grupo *M. chelonae*, *M. abscessus* adquiriu o reconhecimento como patógeno humano responsável por um amplo espectro de infecções de tecidos moles, infecção disseminada em pacientes imunocomprometidos (Griffith et al., 2007) e particularmente em indivíduos com fibrose cística (Esther et al., 2010). Vários surtos de infecções de pele e tecidos moles por *M. abscessus* foram relatados, demonstrando a importância deste organismo em infecções associadas à assistência à saúde (Wallace et al., 1998; Viana-Niero et al., 2008; Leão et al., 2009; Koh et al., 2010). Dentre as MNT, *M. abscessus* corresponde à terceira espécie mais comum implicada em infecções respiratórias, superada apenas por *M. kansasii* e *M. avium* (ATS, 2007).

M. abscessus é a espécie mais virulenta e resistente à quimioterapia dentre todas as MCR patogênicas (Petrini et al., 2006). Aproximadamente 80% das infecções pulmonares por MCR são causadas por *M. abscessus* (Maurer et al., 2012). Em casos de pacientes com fibrose cística submetidos a transplante de pulmão, a infecção por esta espécie gera uma complicação importante no estado de saúde do paciente (Sanguinetti et al., 2001).

No entanto, a maior preocupação representada por este grupo nas instituições de saúde pública deve-se principalmente à sua resistência aos antibióticos (Sanguinetti et al., 2011). A elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos fármacos tornou-se um foco de

pesquisa crescente, particularmente depois que o sequenciamento de genoma completo tornou-se disponível em 2009 (Ripoll et al., 2009).

O tratamento para *M. abscessus* é desafiador, exigindo terapia prolongada com uma combinação de antibióticos que pode ser mal tolerada e apresentar frequentes falhas (Griffith et al., 2007; Jarand et al., 2011).

1.5.1 Taxonomia

A classificação taxonômica do grupo *M. abscessus* tem sido discutida e muitas nomenclaturas foram utilizadas desde seu primeiro isolamento em um abscesso de joelho (Moore e Frerichs, 1953). A princípio acreditava-se que *M. abscessus* era uma subespécie de *M. chelonae* e já foi até mesmo considerado como parte do Complexo *M. fortuitum*, complexo este que também abrange outras espécies de crescimento rápido (van-Ingen et al., 2009). Posteriormente *M. abscessus* foi identificado como uma espécie separada dentro do clado *Abscessus-chelonae*. De fato, as duas espécies foram difíceis de distinguir por características de cultura, provas bioquímicas e até mesmo pelo sequenciamento do gene 16S rRNA (Kirschner et al., 1993; Brown-Elliott e Wallace, 2002). A espécie recém-descrita foi então distinguida e separada de *M. chelonae* por hibridação DNA-DNA (Levy-Frebault et al., 1986; Kusunoki e Ezaki, 1992) e pelo reconhecimento de sua patogenicidade em humanos (Nessat et al., 2012).

Dois outros organismos relacionados, *M. massiliense* e *M. bolletii*, têm sido considerados como espécies, subespécies ou cepas separadas de *M. abscessus* (Holton et al., 2019). Em 2004, *M. massiliense* foi descrito como uma nova espécie por Adekambi e col. (2004) após seu isolamento de uma amostra de lavado broncoalveolar de um paciente com pneumonia hemoptóica. A micobactéria de crescimento rápido, desconhecida até então, possuía perfil bioquímico e de suscetibilidade antimicrobiana compatíveis com os de *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. immunogenum*, indicando que pertenciam ao

grupo *M. chelonae-abscessus*. Os autores haviam determinado anteriormente que uma diferença > 3% nas sequências do gene *rpoB* e > 2% nas sequências do gene *recA* eram suficientes para considerar um isolado de MCR como uma nova espécie. O isolado compartilhava 96% de similaridade nas sequências do gene *rpoB* e 98% de similaridade nas sequências do gene *recA* com a cepa de *M. abscessus*. Estas características genotípicas, somadas a outras características fenotípicas eram representativas de uma nova espécie micobacteriana do grupo, provavelmente derivada de *M. abscessus*, a qual chamaram de *M. massiliense* (Adekambi et al., 2004).

Mais tarde, em 2006, Adekambi e col. realizaram um estudo com o sequenciamento do gene *rpoB*, o qual detectaram três novas espécies de MCR, dentre elas, *M. bolletii*, que compartilhava 100% de similaridade nas sequências do gene 16S e 95,6% de similaridade nas sequências do gene *rpoB* com *M. abscessus*. A distinção das três espécies, então, foi proposta com base nas diferenças na sequência do gene *rpoB* e nos perfis obtidos em provas fenotípicas (Adekambi et al., 2006; Medjahed et al., 2010).

Em 2011, Leão e col. avaliaram que as espécies *M. massiliense* (Adekambi et al., 2004) e *M. bolletii* (Adekambi et al., 2006) não poderiam ser separadas de *M. abscessus* (Moore e Frerichs, 1953) pelos testes fenotípicos ou genotípicos, defendendo que os três nomes deveriam fazer parte de uma mesma espécie, porém com variabilidade interna. Após uma reavaliação desta taxonomia, Leão e col. (2011) propuseram então que as subespécies *M. abscessus* subespécie *massiliense* e *M. abscessus* subespécie *bolletii* fossem combinadas em um único “subgrupo” designado como *M. abscessus* tipo 2, sendo que *M. abscessus* tipo 1 envolve apenas *M. abscessus* subespécie *abscessus*. Naquele momento, *M. abscessus* tipo 2 englobava as duas subespécies, a qual recebia somente a designação de *M. abscessus* subespécie *bolletii* com base na aplicação do Código Bacteriológico (Leao et al., 2011).

A combinação destas duas subespécies foi reavaliada, sendo a resistência induzida aos fármacos macrolídeos um dos principais motivos,

assim como as diferenças de tratamento entre elas (Shallom et al., 2013; Sassi e Drancourt, 2014; Griffith et al., 2015; Tan et al., 2015; Christianson 2016).

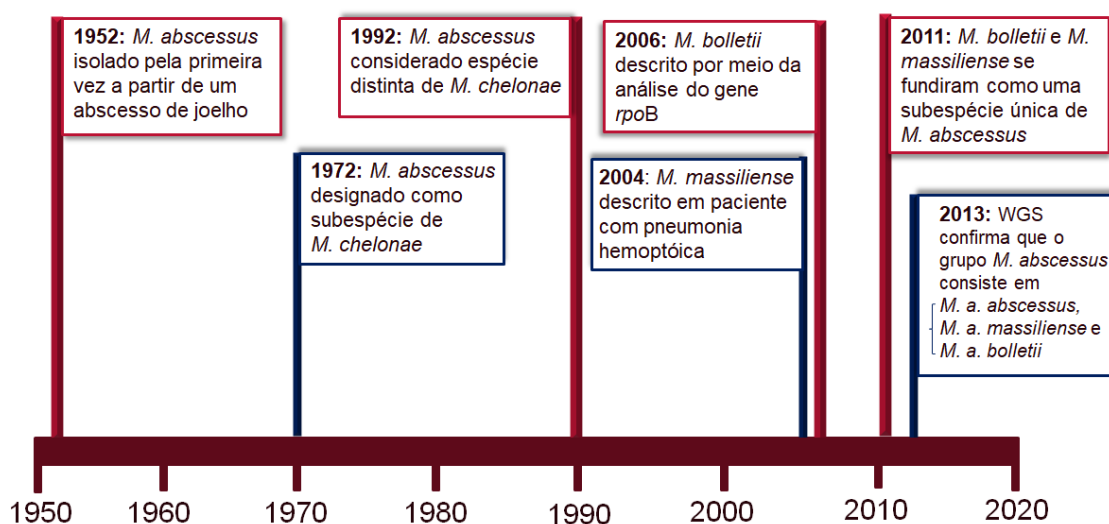
Finalmente, em 2013, Bryant e col. utilizaram o sequenciamento de genoma completo e mostraram, pela primeira vez, que *M. abscessus* subespécie *abscessus*, *M. abscessus* subespécie *bolletii* e *M. abscessus* subespécie *massiliense* são três subespécies distintas pertencentes a um mesmo grupo.

Em 2016, Tortoli e col. argumentaram que a utilização do critério “organismos geneticamente próximos que divergem no fenótipo” como proposto por Wayne e col. (1987) para classificação de organismos como subespécies é apropriada neste caso, levando em consideração a presença de um gene *erm* (41) indutível e funcional em *M. abscessus* subespécie *abscessus* e *M. abscessus* subespécie *bolletii* (associado ao fenótipo de resistência a fármacos macrolídeos), mas não funcional em *M. abscessus* subespécie *massiliense* (associado a um fenótipo suscetível para macrolídeos) (Tortoli et al., 2016).

Atualmente, o grupo *M. abscessus* é dividido em três subespécies: *Mycobacterium abscessus* subespécie *abscessus* (*M. a. abscessus* ou *M. abscessus sensu stricto*), *M. abscessus* subespécie *massiliense* (*M. a. massiliense*) e *M. abscessus* subespécie *bolletii* (*M. a. bolletii*) constituindo o que é agora chamado de grupo *M. abscessus* (MABSC ou MAG), ou *M. abscessus sensu lato* (Tortoli et al., 2016; Bryant et al., 2016., Everall et al., 2017). Estas subespécies intimamente relacionadas são atualmente identificadas pelo sequenciamento do gene *rpoB* e outros genes de manutenção (Macheras et al., 2011). No entanto, o sequenciamento de genoma completo é mais eficaz em discriminar as subespécies com mais precisão (Trovato et al., 2017).

Há poucos relatos sobre as características patogênicas de *M. a. bolletii* e *M. a. massiliense*, embora tenham um amplo perfil de resistência a fármacos semelhante a *M. a. abscessus* (Kim et al., 2008; Adekambi e Drancourt, 2009; Koh et al., 2011). A importância desta classificação taxonômica do ponto de vista clínico é que as três subespécies do grupo podem

diferir uma das outras em seu fenótipo e genótipo de resistência aos antimicrobianos e de virulência, indicando a necessidade da ampliação dos estudos genéticos de resistência (Kim et al., 2010; Bastian et al., 2011). Por exemplo, *M. a. massiliense* é o isolado menos relatado como resistente aos antimicrobianos (possui mutações que o torna sensível ao fármaco claritromicina) enquanto *M. a. bolletii* é a subespécie mais relacionada à resistência, porém, é também a menos frequente em amostras clínicas (a resistência a claritromicina é observada em *M. a. bolletii* e *M. a. abscessus*) (Tan et al., 2017). Existe ainda uma nova hipótese de que *M. a. massiliense* é uma espécie separada e *M. a. bolletii* é uma subespécie de *M. a. abscessus* (Tortoli et al., 2018).



Fonte: Adaptado de Lopeman et al., 2019

Figura 3. Linha do tempo da classificação taxonômica do grupo *M. abscessus* desde seu primeiro isolamento até os dias atuais.

Em resumo, a Figura 3 mostra que inicialmente o organismo era considerado uma subespécie (*M. chelonae* subsp. *abscessus*) e posteriormente foi distinguido e reconhecido como espécie. Em meados da década de 2000

foram descritas as espécies *M. massiliense* e *M. bolletii* com os avanços dos métodos moleculares de identificação. Em 2011 foi proposto que *M. massiliense* e *M. bolletii* fossem reunidos em uma mesma subespécie: *M. abscessus* subespécie *bolletii*. Atualmente, com estudos mais recentes baseados no sequenciamento de genoma completo foi possível dividir as três subespécies dentro do grupo *M. abscessus*.

Recentemente Gupta e col. (2018) realizaram estudos filogenéticos e comparativos abrangendo 150 espécies de micobactérias e, por meio do sequenciamento de genoma completo, estabeleceram uma matriz de similaridade da identidade média de nucleotídeos das espécies do gênero *Mycobacterium*.

Foram estudados marcadores importantes para estudos evolutivos e taxonômicos: os indels de assinatura conservada (CSI), que são inserções ou deleções de aminoácidos presentes em uma posição específica dentro de uma região conservada em um grupo evolutivamente relacionado de espécies, e as assinaturas de proteínas conservadas (CSPs), que são proteínas cujos homólogos são encontrados exclusivamente em um grupo de organismos relacionados.

A partir das assinaturas moleculares, ou seja, da diferença entre nucleotídeos e proteínas geradas pelos fragmentos de DNA, o gênero *Mycobacterium* foi dividido em cinco gêneros, dos quais um grupo manteve-se como *Mycobacterium* (“*Tuberculosis-Simiae*”) e os demais foram distribuídos entre os gêneros: *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus* e *Mycobacteroides*. Estes gêneros correspondem aos seguintes clados, respectivamente: “*Fortuitum-Vaccae*”, “*Terrae*”, “*Triviale*” e “*Abscessus-Chelonae*” baseados nas diferenças de *indels*. A nova árvore, portanto, é baseada no número de polimorfismos (Gupta et al., 2018).

Um dos motivos que despertaram o interesse para estudar a separação do gênero, entre vários outros, foi a considerável diferença no tempo de crescimento entre as micobactérias (Magee e Ward, 2012), que curiosamente

fazia com que os clados que abrangiam a maioria das MCR se ramificassem para lados distintos das MCL em árvores filogenéticas que utilizavam 16S rRNA (Gupta et al., 2018)

O grupo *M. abscessus*, neste caso, foi incluído no gênero *Mycobacteroides*, que é composto pelo clado *Abscessus-chelonae*. No entanto, este clado é separado do clado *Fortuitum-Vaccae* que também é composto por micobactérias de crescimento rápido.

As características fenotípicas deste gênero incluem melhor crescimento a 30°C do que a 35°C, nitrato redutase negativa, absorção negativa de ferro e resistência à polimixina B. O tamanho do genoma para as espécies dentro deste clado varia de 4,5 a 5,6 Mbp e seu conteúdo G + C varia de 63,9 a 64,8% mol (Brown-Elliott e Wallace, 2002).

Turenne e col. (2019) reconhecem que a classificação adequada de MNT aumenta o conhecimento sobre a epidemiologia, melhora a pesquisa e impacta no atendimento clínico de doenças causadas por micobactérias. No entanto, os autores afirmam que é preciso ter cuidado ao realizar as análises genômicas devido à identificação errônea ocasional. Discutem também que os benefícios que esta nova taxonomia pode trazer são questionáveis, visto que toda a identificação de MNT tem o propósito de direcionar a um tratamento correto, aumentando a sobrevivência dos pacientes que fazem uso de antibióticos por seis a 12 meses, podendo chegar a 18 meses e neste caso, não há mudança no comportamento clínico das subespécies.

Tendall e col. (1999) apontam que “o Código Bacteriológico só determina a exatidão de um nome, e não se a interpretação taxonômica está correta”. Diante disso, Basille e col. (2018) concluem que é preciso um balanço entre benefícios e riscos e que a nova nomenclatura não agrega no tratamento.

Portanto, no presente estudo, não será utilizada a nomenclatura proposta por Gupta et. al. (2018), mantendo o grupo *M. abscessus* com as subespécies *M. a. abscessus*, *M. a. bolletii* e *M. a. massiliense*.

1.5.2 Epidemiologia

Estudos de Taiwan (Lai et al., 2010), EUA (Prevots et al., 2010) e Austrália (Thomson, 2010) relataram aumento significativo na prevalência de infecção pulmonar por *M. abscessus* nas últimas duas décadas. Entre 3 a 10% dos indivíduos com fibrose cística nos EUA e na Europa foram infectados com *M. abscessus* (Roux et al., 2009; CF Foundation Patient Registry, 2010), sendo que esta prevalência crescente não foi atribuída a mudanças ou melhorias na intensidade da triagem ou nos métodos de cultura de laboratório (Renna et al., 2009).

Além da forma pulmonar, surtos de infecções cutâneas e de tecidos moles causados pelo grupo estão se tornando mais comuns, com surtos registrados no Reino Unido, EUA, Taiwan e Coréia do Sul nas últimas duas décadas (Viana Niero et al., 2008; Aitken et al., 2012; Bryant et al., 2013; Cheng et al., 2013; Cheng et al., 2016).

No entanto, o Brasil tem visto o maior número, com mais de 2.128 infecções de pele e tecidos moles relatadas em 23 estados desde 2004, incluindo grandes surtos em 15 estados (Leão et al., 2010; Lorena et al., 2010; Guimarães et al., 2016). Em contraste, apenas 13 casos de *M. abscessus* foram relatados no Brasil nos anos anteriores à epidemia (Leão et al., 2010). Técnicas de tipagem molecular sugeriram que os surtos, ocorridos em locais geograficamente distantes no Brasil, foram causados por uma única linhagem de *M. a. massiliense*. Os isolados foram amostrados de infecções de feridas pós-cirúrgicas coletadas durante o surto inicial no Pará (2004–2005) (Viana Niero et al., 2008) e surtos subsequentes em Goiás (2005–2007) (Cardoso et al., 2008), Rio de Janeiro (2006–2007) (Duarte et al., 2009), Paraná (2007–2008) (Monego et al., 2011) e Rio Grande do Sul (2007–2011) (Nunes et al., 2014). Foram identificados nestes isolados sequências idênticas para o gene utilizado na identificação, *rpoB*, e padrões também idênticos obtidos pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A maioria das

infecções destes surtos ocorreu após cirurgias videoassistidas, onde o equipamento havia sido desinfetado com solução de glutaraldeído a 2%. Os isolados recuperados desses pacientes eram resistentes ao glutaraldeído a 2% e 8%, como descrito por Lorena e col (2010). A resistência aos desinfetantes, combinada com a observação de más práticas de esterilização dos instrumentos cirúrgicos, levou à hipótese de que uma linhagem de *M. a. massiliense* estava exposta a níveis não letais de glutaraldeído, resultando na seleção de um fenótipo resistente ao glutaraldeído, que pode ter se multiplicado dentro de ambientes cirúrgicos no Brasil (Cardoso et al., 2008; Viana-Niero et al., 2008; Duarte et al., 2009; Leão et al., 2010; Lorena et al., 2010; Monego et al., 2011; Nunes et al., 2014).

Exatamente como a linhagem se espalhou para muitos hospitais no Brasil ainda não está claro. Tanto o envolvimento de cirurgiões que transportam seus próprios equipamentos para múltiplos locais cirúrgicos, como a utilização de soluções de glutaraldeído não ativadas comercialmente e contaminadas, têm sido sugeridos como possíveis mecanismos de transmissão (Duarte et al., 2009; Lorena et al., 2010). Isolados correspondendo ao mesmo padrão de PFGE do surto foram encontrados não apenas de infecções pós-cirúrgicas, mas também em espécimes de escarro, urina e amostras de endoscópios em locais e períodos diferentes à ocorrência de surtos (Matsumoto et al., 2011; Guimarães et al., 2016). Este achado levou a especulação de que a causa dos surtos poderia ser uma linhagem ambiental brasileira, em oposição a uma linhagem recentemente adaptada ao nicho cirúrgico e espalhados por cirurgiões ou desinfetantes contaminados (Everall et al., 2017).

Em São Paulo, o Laboratório de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz (NTM) realiza o diagnóstico das micobacterioses causadas pelo grupo *M. abscessus* para todo o estado de São Paulo e tem verificado esse aumento nos últimos anos. Em 2012, o isolamento das espécies desse grupo foi 6,4% do total de isolados identificados. Em 2016 essa porcentagem chegou em 9,1%, acompanhado do aumento do número de solicitações de

teste de suscetibilidade. O número absoluto de testes de suscetibilidade realizados no NTM foi de 12 em 2012, passando para 182 em 2017 (comunicação pessoal). Somente em 2017 houve um aumento de 40% no número de testes realizados, reflexo da quantidade de isolados identificados que se enquadram nos critérios bacteriológicos de doença (ATS, 2007), sugerindo a existência de uma demanda reprimida e que foi comprovada com a execução de uma média de 200 exames anuais em 2018 e 2019 (comunicação pessoal). Como este tipo de teste não é realizado na maioria dos laboratórios brasileiros devido à sua complexidade, não existem dados sobre a vigilância da resistência aos fármacos para as micobactérias não tuberculosas.

1.5.3 Critérios diagnósticos

Como a doença pulmonar por MNT tem, geralmente, uma progressão lenta, há tempo suficiente para fazer a coleta de diversas amostras respiratórias no intuito de se obter um diagnóstico adequado (ATS,2007).

Quando o diagnóstico não é claro, é necessário buscar a consulta com um especialista. É responsabilidade do médico solicitar a coleta de amostras suficientes e acompanhar o paciente por um longo período de tempo até que este diagnóstico seja confirmado ou refutado (ATS, 2007).

Os critérios diagnósticos sugeridos pela ATS (2007) para doença pulmonar por MNT estão listados no quadro 1.

Quadro 1. Critérios clínicos e microbiológicos para o diagnóstico de doença pulmonar por *M. abscessus* (e MNT de maneira geral) baseados em um documento oficial da ATS (2007).

Clínicos (ambos obrigatórios)	
1-	Sintomas pulmonares, opacidades nodulares ou cavitárias na radiografia de tórax ou uma tomografia computadorizada de alta resolução que mostra bronquiectasia multifocal com vários nódulos pequenos
e	
2-	Exclusão adequada de outros diagnósticos
Microbiológicos	
1-	Resultados positivos de cultura de pelo menos duas amostras separadas de expectoração
ou	
2-	Resultado positivo da cultura de pelo menos um lavado brônquico
ou	
3-	Biópsia pulmonar transbrônquica ou outra biópsia pulmonar com características histopatológicas micobacterianas (inflamação granulomatosa ou BAAR) e cultura positiva para MNT ou biópsia mostrando características histopatológicas micobacterianas (inflamação granulomatosa ou BAAR) e um ou mais escarro ou lavagens brônquicas positivas para MNT.

Adaptado de Uma Declaração Oficial ATS/IDSA, 2007.

Diretrizes anteriores a ATS incluíam recomendações baseadas na quantificação de esfregaços e culturas. No entanto, existem laboratórios que não possuem resultados quantitativos, principalmente pelo uso de meio de culturas líquidos. Portanto, muitos diagnósticos são dados baseados na positividade ou negatividade dos esfregaços e da cultura, sem quantificação (ATS, 2007).

Como as MNT podem ser isoladas devido à contaminação ambiental, como por exemplo da água, e assim, incluir a contaminação de amostras

clínicas, mais de uma amostra clínica se faz necessária para o diagnóstico, exceto quando existem achados radiológicos que ajudem na confirmação.

Pacientes com suspeita de doença pulmonar por MNT, mas que não se enquadram nos critérios diagnósticos devem ser acompanhados até que o diagnóstico seja, então, estabelecido ou excluído (ATS, 2007).

Uma vez diagnosticado, não necessariamente deve ser instituída a terapia, esta decisão será baseada nos riscos e benefícios para cada indivíduo (ATS, 2007).

No caso de doença de pele, tecidos moles ou doença óssea, o diagnóstico é feito por cultura do material de drenagem ou biópsia de tecido. A biópsia de tecido é a opção mais sensível para obter amostra para cultura (ATS, 2007).

1.5.4 Apresentações clínicas mais importantes

Na doença pulmonar por MNT, os sintomas variam e são inespecíficos. No entanto, praticamente todos os pacientes apresentam tosse crônica ou recorrente. Os demais sintomas variam entre produção de expectoração, fadiga, mal-estar, dispneia, febre, hemoptise, dor no peito e perda de peso. Com o avanço da doença pulmonar, os sintomas vão progredindo e prevalecendo. Na avaliação, estes sintomas ainda podem ser misturados com outros, causados por doenças pulmonares coexistentes, como bronquiectasia, doença obstrutiva crônica das vias aéreas associada ao tabagismo, FC e pneumoconiose. Na ausculta torácica, os achados podem incluir roncosp, estertores crepitantes, sibilos e guinchos (ATS, 2007).

Na doença de pele, tecidos moles ou doença óssea podem ser observadas formação de abscesso no local de feridas, lesões traumáticas abertas ou fratura (Wallace et al., 1983). Infecções nosocomiais de pele e tecidos moles também ocorrem, podendo incluir: infecções por cateteres

intravenosos ou peritoneais de longo prazo, abscessos pós injeção, infecções após lipoaspiração ou infecções de ferida cirúrgica da pele após mamoplastia de aumento, infecções após cirurgia de by-pass cardíaco ou infecções da córnea após cirurgias a laser (LASIK) (Wallace et al., 1989; Wallace et al., 1993; Maloney et al., 1994; ATS, 2007)

A infecção granulomatosa crônica pode se desenvolver nas bainhas dos tendões, bursas, articulações e ossos após inoculação direta do microrganismo por meio de traumas acidentais, incisões cirúrgicas, feridas por punção ou injeções incluindo esteroides intra-articulares e bursais (ATS, 2007). Também podem ser observados casos de osteomielite pós contusão e osteomielite no esterno após cirurgia cardíaca (Wallace et al., 1989; Chan et al., 2001).

1.5.5 Tratamento

Infecções causadas pelo grupo *M. abscessus* são de difícil tratamento (Ballarino et al., 2009; Jeon et al., 2009). Uma vez que essas espécies são intrinsecamente resistentes não apenas aos fármacos antituberculose clássicos, mas também à maioria dos antibióticos atualmente disponíveis (Brown-Elliott e Wallace, 2002), até o momento não foi estabelecido um regime terapêutico padronizado para infecções pulmonares causadas por *M. abscessus* (ATS, 2007).

A infecção pulmonar causada por *M. abscessus* é uma doença infecciosa crônica caracterizada por resposta clínica variável à terapia, recorrência e pouca chance de cura, por isso, continua sendo desafiadora para tratar. A ressecção cirúrgica de bronquiectasias focais e cavitações é frequentemente necessária como parte do regime terapêutico (ATS, 2007; Griffith, 2011). A maioria dos pacientes responde clínica e microbiologicamente à terapia antibiótica e/ou cirúrgica, mas a resposta é frequentemente temporária. Estudos concluíram que uma remissão prolongada e possível cura são atualmente

atingíveis em apenas uma minoria de pacientes (Jeon et al., 2009; Jarand et al., 2011).

A administração dos antibióticos, de início, é empírica, mas após o isolamento da micobactéria e identificação de subespécies passa a ser baseada no teste de suscetibilidade aos antibióticos *in vitro* (TSA). O teste padronizado pelo CLSI para micobactérias é a microdiluição em caldo (ATS, 2007; Ryu et al, 2016; CLSI, 2018).

Medicamentos macrolídeos (azitromicina, claritromicina, eritromicina e roxitromicina) são utilizados para o tratamento de infecções por MNT, incluindo *M. abscessus*, *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. chelonae* (Dautzenberg et al., 1991; Brown e Wallace, 2002; Leclercq, 2002). Entretanto, especificamente para *M. abscessus*, poucos são os fármacos ativos, sendo os macrolídeos de escolha a claritromicina e azitromicina e os aminoglicosídeos amicacina e tobramicina (Dautzenberg et al., 1991; Griffith et al., 2006; ATS, 2007; Wallace et al., 2014; Waters e Ratjen, 2014). Contudo, a resistência adquirida pode ser observada, especialmente em pacientes previamente tratados (Wallace et al., 1996; Griffith et al., 2006, Renvoise et al., 2015). Assim, recomenda-se a realização do teste de suscetibilidade aos fármacos antes do início da terapia e em cada episódio recorrente (Mougari et al., 2017).

Outras opções disponíveis para tratamento das infecções causadas por *M. abscessus*, mas de eficiência limitada, incluem os antibióticos β -lactâmicos parenterais cefoxitina e imipenem, que apresentam moderada atividade *in vitro*. Outros antibióticos β -lactâmicos (exceto o meropenem) não têm atividade *in vitro* considerável, devido à sua rápida hidrólise por uma beta-lactamase de amplo espectro (*bla*_{Mab}) (Rominski et al., 2017).

Dados obtidos na rotina diagnóstica do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz sobre o perfil de suscetibilidade de *M. abscessus* isolados no período de 2008 a 2017 no Estado de São Paulo mostram que o perfil geral de resistência para claritromicina, amicacina, ciprofloxacina, doxiciclina e cefoxitina foi de 48,3%, 6,4%, 60,5%, 87,7% e

21,3%, respectivamente. Neste estudo, o fármaco cefoxitina apresentou um aumento de 4,7% para valores intermediários no período entre 2014 a 2016, porém revelou aumento de resistência em 2017, mostrando a importância do alerta dado por valores intermediários. No ano de 2017, houve aumento para todos os fármacos testados, exceto amicacina, com queda de 6%, demonstrando sua importância como um dos fármacos escolhidos para o tratamento (comunicação pessoal).

Na década de 1990, a claritromicina tornou-se o fármaco de escolha para infecções por *M. abscessus* e foram relatados sucessos terapêuticos (Griffith et al., 1993; Maxson et al., 1994; Mushatt e Witzig, 1995). Entretanto, episódios de resistência ao tratamento foram descritos, principalmente em casos de monoterapia (Wallace et al., 1996; Petrini, 2006). As atuais recomendações sugerem a associação de claritromicina com um aminoglicosídeo (geralmente amicacina) e outro fármaco injetável, como cefoxitina ou imipenem (ATS, 2007). A eficácia clínica dessa poliquimioterapia ainda é controversa, com sucesso para alguns pacientes e falha para outros (Jeon et al., 2009; Lyu et al., 2011).

Para impedir o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos, os médicos que cuidam da fibrose cística em pacientes colonizados por *M. abscessus* devem tentar evitar a utilização de antimicrobianos macrolídeos, aminoglicosídeos, imipenem e linezolida no tratamento de outras infecções que possam vir a ocorrer nesta população (Floto et al., 2016).

A duração e a intensidade da terapia contra *M. abscessus* são individualizadas, de acordo com o progresso microbiológico, radiográfico e clínico. Frente à dificuldade de alcançar a cura (definida como 12 meses de culturas de escarro negativas) os sintomas e a melhora radiográfica são geralmente os marcadores para guiar a duração do tratamento de *M. abscessus* pulmonar. No entanto, na prática clínica a duração da terapia é limitada pela toxicidade dos antimicrobianos (ATS, 2007). Ainda não existe uma terapia

definida contra *M. abscessus*, no entanto, existem tentativas de padronização, como as abordagens a seguir (Quadro 1).

Quadro 2. Regime de tratamento para infecção por *M. abscessus* adaptado de Ruvandhi et al., 2019

Fase do tratamento	Número e tipo de antibióticos	Regimes sugeridos ^a
Indução (até oito semanas ou mais, dependendo da extensão da doença, padrão de resistência, hospedeiro com doença subjacente)	3-4 antibióticos sendo pelo menos 1-2 agentes I.V. ativos	Amicacina I.V. + Imipenem I.V. ou Cefoxitina ou Tigeciclina + Azitromicina + Clofazimina
Consolidação (12 a 18 meses)	2-3 antibióticos ativos orais ou inalatórios	Azitromicina + Clofazimina + 3º agente (uma alternativa oral, como linezolida ^b ou bedaquilina, se as susceptibilidades permitirem após consulta de um especialista, principalmente para terapia de resgate, caso contrário, amicacina inalada) OU No caso de indivíduos com opções orais limitadas, prolongar fase de indução pelo tempo que for possível, seguir com medicação de duração variável
Supressiva (Consideração em alguns pacientes)	2 antibióticos ativos: oral/inalatório	Azitromicina + Clofazimina + Amicacina inalatória ^c OU No caso de indivíduos com opções orais limitadas, interromper terapia após fase de indução intravenosa prolongada com monitoramento clínico e potencial terapia intravenosa futura em caso de piora

^a: Este regime sempre dependerá do perfil de suscetibilidade, incluindo a avaliação de um gene *erm* funcional

^b: A dose de linezolida é tipicamente 600 mg por dia e a vitamina B6 concomitante é recomendada pelos autores.

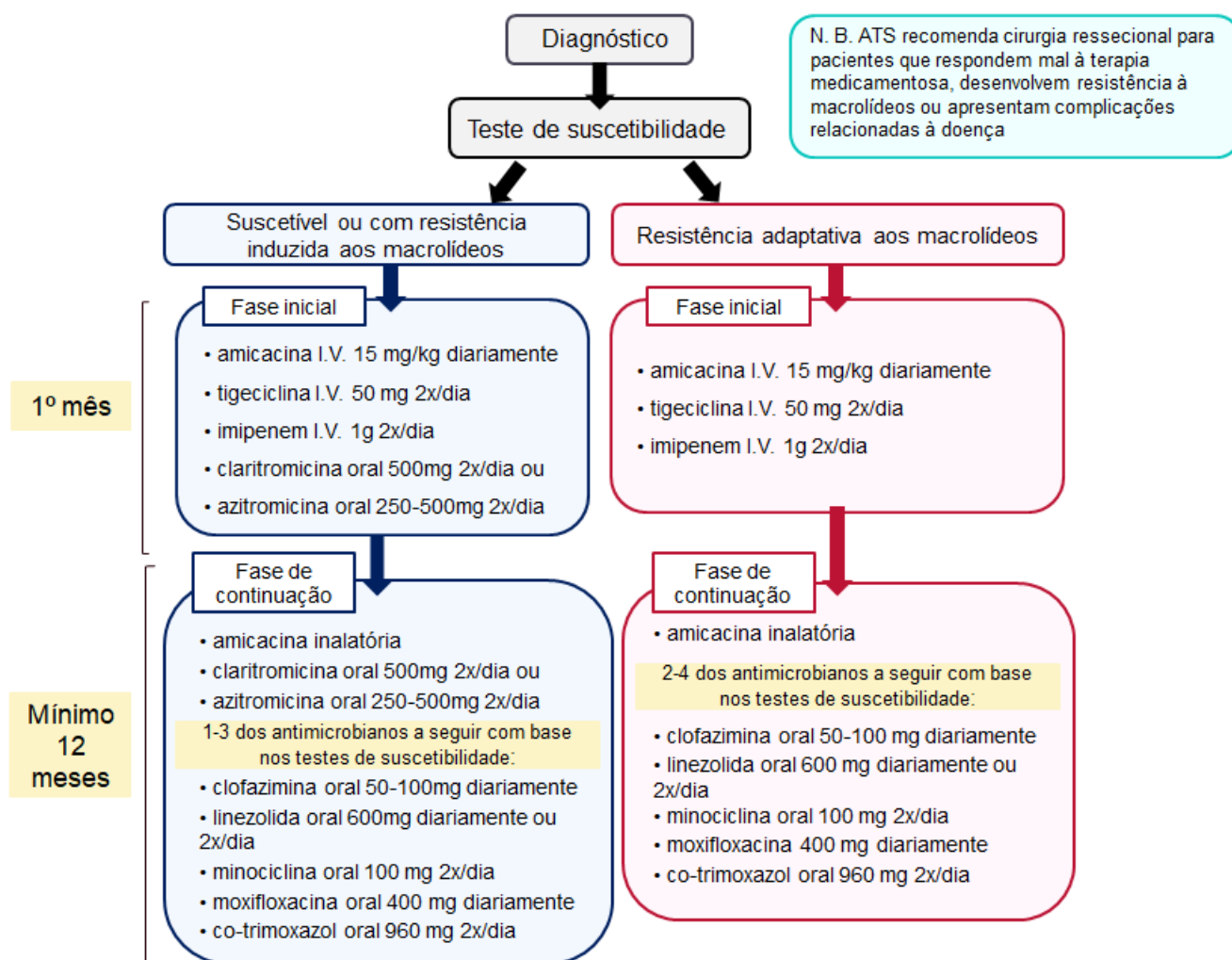
^c: Apesar dos dados limitados sobre os resultados do tratamento com amicacina inalatória, esta costuma ser usada como um terceiro agente no quadro clínico, embora normalmente não se espera que seja um medicamento totalmente ativo. Estudos avaliando a lipossômica inalada (Arikayce) demonstram piores resultados em pacientes com infecções por *M. abscessus* do que

naqueles com infecções complexas por *M. avium* (embora os números fossem pequenos), portanto esse agente não está sendo procurado por essas infecções.

Outra complicação no tratamento da infecção por *M. abscessus* é a falta de evidências de que a suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos corresponda à eficácia *in vivo* (ATS, 2007).

A Sociedade Torácica Americana (ATS, 2007) sugere que alguns pacientes podem ter melhor chance de regressão da doença se submetidos a cirurgia resecional, principalmente em casos de má resposta a terapia, resistência aos fármacos.

As atuais diretrizes de tratamento da Sociedade Torácica Britânica (BTS) (Haworth et al., 2019) recomendam que o regime terapêutico deva conter antimicrobianos intravenosos e orais na fase inicial, seguido de uma fase de continuação com antimicrobianos orais e inalatórios (Figura 4) e que a análise genética dos isolados pode fornecer informações sobre a resistência induzida aos macrolídeos - pela análise do gene *erm*(41) – e/ou presença de mutação pontual em 23S rRNA (resistência adaptativa ou constitutiva) direcionando para regimes de tratamento específicos.



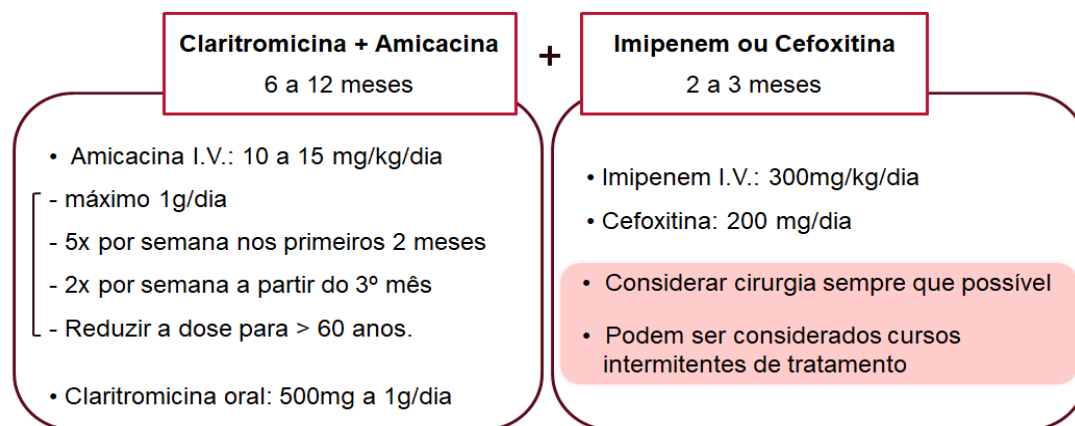
Fonte: Adaptado de Loperman et al., 2019

Figura 4. Fluxograma do regime terapêutico para doença pulmonar pelo grupo *M. abscessus* baseada em resultados laboratoriais de suscetibilidade aos fármacos e recomendada pela Sociedade Torácica Britânica.

No fluxograma acima, a conduta terapêutica depende da suscetibilidade ou não dos isolados aos macrolídeos. O primeiro mês de tratamento envolve três antimicrobianos intravenosos e, no caso dos suscetíveis ou resistentes induzidos aos macrolídeos, um dos macrolídeos orais. A fase de continuação também depende dos resultados dos testes de suscetibilidade laboratoriais, e,

nesta fase, pode ser administrado de um a quatro antimicrobianos por no mínimo um ano. Caso o paciente não esteja respondendo a terapia, a BTS recomenda a ressecção cirúrgica da área infectada.

No Brasil, até o momento, a única recomendação publicada é a do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (CVE), que propõe esquemas terapêuticos para as MNT pulmonares mais frequentes no estado. Para o grupo *M. abscessus* (Figura 5) o recomendado é claritromicina em associação a amicacina de seis a 12 meses mais imipenem ou cefoxetina por dois a três meses, considerando que cursos intermitentes de tratamento podem ser utilizados, visto que a doença pulmonar é incurável atualmente e cirurgia sempre que possível (Endereço eletrônico: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/tuberculose/doc/tb11_3mntsb.pdf).



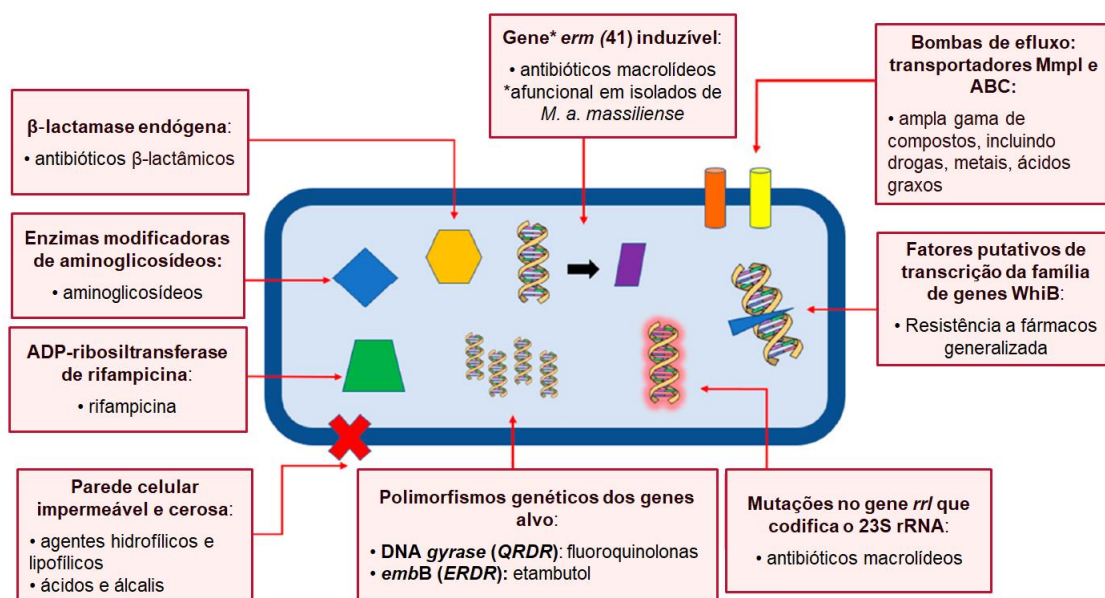
Fonte: Adaptado de CVE, 2011.

Figura 5. Regime terapêutico recomendado pelo CVE para doença pulmonar por *M. abscessus*.

O tratamento de *M. abscessus* pode ser melhorado com a adição de corticoesteróides e inibidores de betalactamases. Um estudo relatou que o uso de claritromicina, amicacina, imipenem/cilastatina para tratar infecção por *M. abscessus* foi muito reforçado com a adição dos corticoesteroides (Okazaki et al., 2012). Os inibidores de betalactamases também podem ser administrados concomitantemente com o tratamento (cefoxitina e imipenem, fármacos importantes na terapia contra *M. abscessus* são beta-lactâmicos), visto que um dos mecanismos de resistência enzimática de *M. abscessus* é a produção de uma beta-lactamase endógena, *bla*_{Mab}. Em 2015, Dubee e col. mostraram que o inibidor de beta-lactamase avibactam inibiu com eficiência *bla*_{Mab}. Mais recentemente, em 2017, Lefebvre e col. demonstraram que avibactam melhora a eficácia de imipenem *in vitro* e em modelos de macrófagos e zebrafish.

1.5.6 Mecanismos de resistência aos macrolídeos

Vários mecanismos são responsáveis pela resistência natural das micobactérias aos fármacos, incluindo o crescimento lento, o alto conteúdo lipídico, a presença de uma espessa parede celular impermeável cerosa, que atua como uma barreira física (exclusão de tamanho) e química (hidrofóbica), sistemas de exportação de fármacos e polimorfismo genético de genes alvo (Nessar et al., 2012). A parede celular das micobactérias também contém bombas de efluxo (De Rossi et al., 2006) e porinas, que atuam sinergicamente com sistemas internos que são ativados pela presença de antimicrobianos. Além disso, a baixa permeabilidade da parede celular micobacteriana colabora para que a bactéria tenha tempo para induzir a expressão de genes de resistência aos fármacos (Nguyen e Thompsom, 2006).



Fonte: Adaptado de Lopeman et al., 2019.

Figura 6. Mecanismos de resistência exibidos por *M. abscessus*.

Na Figura 6, existem vários mecanismos envolvendo diferentes processos fisiológicos, enzimáticos e genômicos que contribuem para o perfil resistente a fármacos de *M. abscessus*. É provável que esses processos, como bombas de efluxo e genes de resistência a fármacos, trabalhem em sinergia, o que resulta neste patógeno altamente resistente (Lopeman et al., 2019).

O macrolídeo claritromicina é considerado o pilar da quimioterapia antimicrobiana de infecções pulmonares por *M. abscessus* (Brown et al., 1992; Mushatt e Witzig, 1995; ATS, 2007) por ser o único fármaco de eficácia comprovada que pode ser administrado por via oral. Dois mecanismos de resistência estão bem estabelecidos para este fármaco (Maurer et al., 2012), a resistência adquirida e a induzida (Nash et al., 2009).

Os macrolídeos representam uma classe de antibióticos que tem como alvo o operon rRNA, impedindo que a peptidiltransferase adicione o grupo peptidil ligado ao tRNA ao próximo aminoácido e inibindo a translocação ribossômica (Poehlsgaard e Douthwaite, 2003).

O mecanismo de resistência adquirida conta com uma alteração no sítio de ligação do fármaco, ou seja, uma mutação pontual ocorre no gene *rrl*, nas posições dos nucleotídeos 2058 ou 2059 (Sander et al., 1997; Pfister et al., 2004; Pfister et al., 2005; Akshay et al., 2011) promovendo uma mudança de base A para G (Wallace et al., 1996), região esta, que codifica o domínio peptidiltransferase do gene 23S rRNA (Wallace et al., 1996). Com esta mutação, a resistência se dá por meio da metilação pós-transcricional do RNA ribossômico 23S, inibindo assim a fixação do fármaco. Este mecanismo resulta em resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (Leclercq, 2002) e é capaz de conferir altos níveis de resistência *in vitro* (CIM >128 mg/L) (Bottger et al., 2011) em espécies bacterianas com um número limitado de operons de rRNA cromossômico, incluindo *M. chelonae* e *M. abscessus* (Meier et al., 1994; Nash et al., 1995; Wallace et al., 1996, Bottger et al., 2011). A resistência aos macrolídeos adquirida por mutações no gene *rrl*, geralmente ocorre em espécies micobacterianas, bem como foram descritas para os isolados de *M. avium*, *M. abscessus* e *M. chelonae* (Wallace et al., 1996; Bastian et al., 2011; Inagaki et al., 2011 Maurer et al., 2012) não existindo muitos relatos de incidência em outras espécies bacterianas (Meier et al., 1994; Nash et al., 1995; Tebas et al., 1995; Meier et al., 1996).

O segundo mecanismo de resistência é conferido por uma classe de genes que codificam uma metilase resistente a eritromicina, do inglês “*erythromycin resistance methylase*” (*erm*), ou seja, o gene *erm* codifica enzimas mono ou dimetiltransferases que causam uma metilação específica em uma única adenina na região peptidil transferase do RNA ribossômico 23 rRNA resultando em resistência aos macrolídeos. Como as espécies de *Mycobacterium* possuem apenas um ou dois operons *rrn*, a alteração deste sítio específico (Figura 7) é fundamental para o desenvolvimento de resistência (Vester e Douthwaite, 2001).

Foram relatados 33 genes *erm*, dos quais, cinco [*erm* (37), *erm* (38), *erm* (39), *erm* (40) e *erm* (41)] foram identificados dentro do

gênero *Mycobacterium* (Roberts, 2008), incluindo *M. tuberculosis*, que abriga *erm*(37) (Buriankova et al., 2004), *Mycobacterium goodii* e *Mycobacterium smegmatis* [que possuem *erm*(38)], *Mycobacterium fortuitum* [*erm* (39)], *Mycobacterium mageritense* e *Mycobacterium wolinskyi* [*erm* (40)] (Nash et al., 2006; Nash et al., 2009). Nash e col. (2009) demonstraram que um representante dessa família gênica, *erm* (41), está presente em *M. abscessus*, mas não está relacionado a *M. chelonae*. Espécies em que não foram encontrados os genes *erm* incluem *Mycobacterium peregrinum* e *Mycobacterium senegalense* (Nash et al., 2006; Nash et al., 2009).

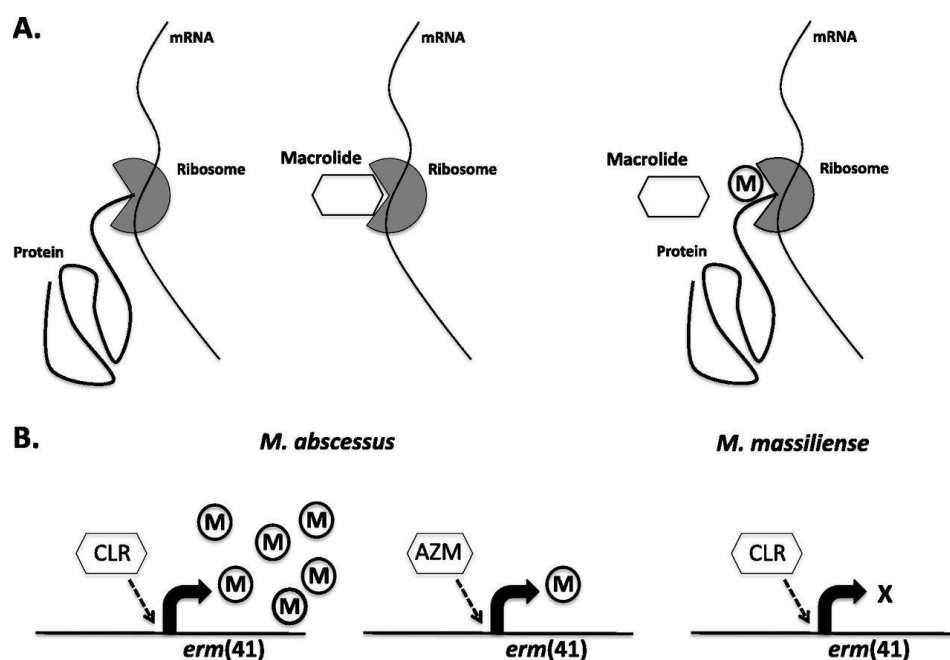
Já em outras espécies bacterianas, como *Staphylococcus aureus*, a presença de um gene *erm* tem sido associada à falha em caso de monoterapia com clindamicina (Lewis e Jorgensen, 2005).

Os genes *erm* estão envolvidos na resistência a claritromicina para o grupo *M. abscessus*, mas a expressam somente em situação de estresse bacteriano, como por exemplo, na presença do fármaco, por isso este mecanismo de resistência aos macrolídeos foi definido como resistência induzida (Bailey et al., 2008; Nash et al., 2009). Esta indução do gene *erm*(41), responsável pela resistência induzida aos macrolídeos, é maior após a exposição a claritromicina em comparação com a azitromicina (Stout et al., 2012).

Em 2009, Nash e col. mostraram que embora uma cepa possa parecer suscetível após três dias de incubação no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos recomendados para MCR (CLSI, 2018), devido à indução da síntese da metiltransferase, a cepa se torna, na verdade, resistente à claritromicina (Nash et al., 2009). Somente se a incubação for estendida para 14 dias ou se a cepa fosse pré-incubada com claritromicina o resultado de resistência poderá ser observado (Griffith et al., 2007).

Apesar de envolvido na resistência a claritromicina, o gene *erm*(41) apresenta diferentes características em subespécies de *M. abscessus*. Comparado com *M. a. abscessus* e *M. a. bolletii*, que possuem uma

resistência em alto nível (CIMs > 32 mg/L) a metilase de *erm* em *M. a. massiliense* é não funcional (Figura 7) devido a uma deleção de 2 pb dos nucleotídeos 64-65 e outra deleção de 274 pb nos nucleotídeos 159-432 (Nash et al., 2009; Bastian et al., 2011).



Fonte: Stout e Floto, 2012.

Figura 7. Mecanismo de ação dos macrolídeos e resistência induzida. (A) Os macrolídeos ligam-se ao RNA ribossomômico 23S, impedindo a síntese proteica bacteriana. A expressão das proteínas *erm* (metilases de resistência à eritromicina, demonstradas como “M”) em resposta aos macrolídeos conduz à modificação do seu local de ligação ribossômica e à indução de resistência aos macrolídeos. (B) Nenhum macrolídeo pode induzir resistência em *M. a. massiliense* por ser portador de um gene *erm(41)* disfuncional.

A funcionalidade da metilase produzida por *erm* também é dependente de um nucleotídeo localizado na posição 28 do gene *erm* (41). *M.*

a. *abscessus* pode apresentar dois genótipos *erm*(41): T28 ou C28. Quando o nucleotídeo encontrado é do tipo selvagem T28, a resistência induzida à claritromicina é verificada. Com a presença de um polimorfismo alterando o nucleotídeo para C28, a resistência não é observada (Wallace et al., 1996; Nash et al., 2009; Mougari et al., 2017).

Quadro 3. 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.

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

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

Fonte: Carvalho, 2014.

Em 2009, Nash e col. descreveram duas cepas (MAB30 e MC1028) de *M. a. abscessus* que continha um gene *erm* não funcional. As cepas não possuíam resistência induzida à claritromicina e, mesmo após incubação prolongada, demonstraram CIMs para claritromicina suscetíveis. A perda de função dos genes *erm* foi associada a uma substituição T28C no gene *erm*

(T28C), levando a uma mudança de aminoácidos de Trp para Arg no códon 10. Não está claro o motivo da proteína com Arg10 estar associada à suscetibilidade enquanto Trp10 está associada à resistência. Nash e col. (2009) mostraram que essas diferenças não tinham efeito no nível de transcrição de RNA e concluíram que a proteína portadora de Arg10 não era funcional (Nash et al., 2009; Brown Elliot et al., 2015).

Bastian e col. (2011) relataram em seu estudo que as mutações encontradas no gene *rrl* conferindo resistência adquirida à claritromicina foram limitadas a subespécie *M. a. massiliense* e também a *M. a. abscessus* do tipo C28, os quais não possuem uma metilase de *erm* funcional, enquanto nenhuma mutação foi encontrada em *M. a. abscessus* do tipo selvagem T28. Isto sugeria que a seleção para mutações no gene *rrl* que conferiam resistência à claritromicina era menos provável de ocorrer em cepas contendo metilases *erm* intactas (Bastian et al., 2011).

Mais tarde, os dados relatados por Maurer e col. (2012) mostraram que a resistência mediada por *erm* e *rrl* à claritromicina pode ocorrer simultaneamente em isolados de pacientes, e que a presença de um *erm* funcional não exclui a seleção para mutações de *rrl* como sugerido anteriormente (Bastian et al., 2011).

Maurer e col. (2012) colocam ainda que a explicação possa estar nas metilases de *erm*. As metilases são conhecidas por produzirem diferentes valores de CIM para macrolídeos, lincosamidas, estreptogramina B (MLS_B) e antibióticos cetolídeos dependendo se elas atuam como mono ou dimetilases na posição 2058 do rRNA 23S (Liu e Douthwaite, 2002). O mesmo ocorre em outros representantes dessa classe de enzimas que foram descritos em outras micobactérias (Madsen et al., 2005; Nash et al., 2005; Nash et al., 2006). A ocorrência de mutações *rrl* em isolados com o gene *erm*(41) intacto podem, portanto, refletir uma modificação limitada do 23S rRNA posição 2058 por monometilação (Maurer et al., 2012).

A resistência adquirida por mutação distingue-se da resistência induzida pelo achado de resistência inicial (3 a 4 dias) em CIMs de claritromicina e é relativamente menos comum em *M. a. abscessus* provavelmente porque esta espécie possui e expressa a resistência induzida conferida pelo gene *erm* (41) (Wallace et al., 1996).

1.5.7 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é recomendado para MNT quando comprovada a infecção (Griffith et al., 2007). Os fármacos que devem ser testados são aqueles com atividade demonstrada em uma determinada espécie, e devem ser testados quando há suspeita de resistência adquirida, isto é, infecção recorrente ou um paciente previamente tratado, além de isolados recuperados de pacientes imunocomprometidos, como pacientes HIV positivos e pessoas com malignidades (Griffith et al., 2007; CLSI, 2011). De acordo com a Sociedade Torácica Americana, para realização do teste de suscetibilidade aos fármacos deve ser considerada a significância clínica do isolado, ou seja, se está de fato causando doença e se há padronização de teste para a espécie identificada, visto que nem todas as espécies e seus respectivos antimicrobianos possuem pontos de corte estabelecidos e validados (ATS, 2007).

O método recomendado para o teste de suscetibilidade aos fármacos utilizados no tratamento das MNT é a microdiluição em caldo (CLSI, 2018) e o tempo para resultados depende do tempo de crescimento das espécies micobacterianas, com resultados obtidos após alguns dias (micobactérias de crescimento rápido) ou após semanas (crescimento lento) de incubação.

Como os isolados do grupo *M. abscessus* apresentam diferentes perfis de suscetibilidade a claritromicina, é necessário realizar o teste de

suscetibilidade aos antimicrobianos para escolher o tratamento adequado (Petrini, 2006; Huang et al., 2010).

Para a detecção da resistência induzida aos macrolídeos fenotipicamente, o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) M24 A-3 sugere um tempo de incubação de 14 dias para testes de suscetibilidade de macrolídeos por microdiluição em caldo, mas também afirma que mais estudos incluindo um grande número de isolados são necessários para determinar o tempo de incubação ideal para interpretação da CIM para macrolídeos (CLSI, 2018).

No entanto, este método exige equipes treinadas e com conhecimento especializado. A leitura correta de CIM e interpretação dos resultados requerem uma experiência profissional, além de que demanda tempo, mesmo no caso das MCR, como *M. abscessus*. (Nash et al., 2009).

Christianson e col., em seu estudo de 2016, concluíram que recomendar a adição de uma leitura de sete dias dos painéis de microdiluição em caldo às diretrizes do CLSI melhoraria os tempos de reversão para a maioria (>80%) dos isolados de *M. abscessus* com resistência induzida aos macrolídeos. Em contrapartida, verificaram que a adição de uma leitura de 21 dias não acrescentou qualquer valor ao teste (Christianson et al., 2016).

A leitura visual da CIM pode muitas vezes não ser precisa, especialmente quando o crescimento bacteriano é muito tênue, dificultando a interpretação dos resultados (Ramis et al., 2015). Dessa forma, o uso de corantes, como a resazurina, pode facilitar a leitura visual e torná-la mais acurada (Carvalho et al., 2016).

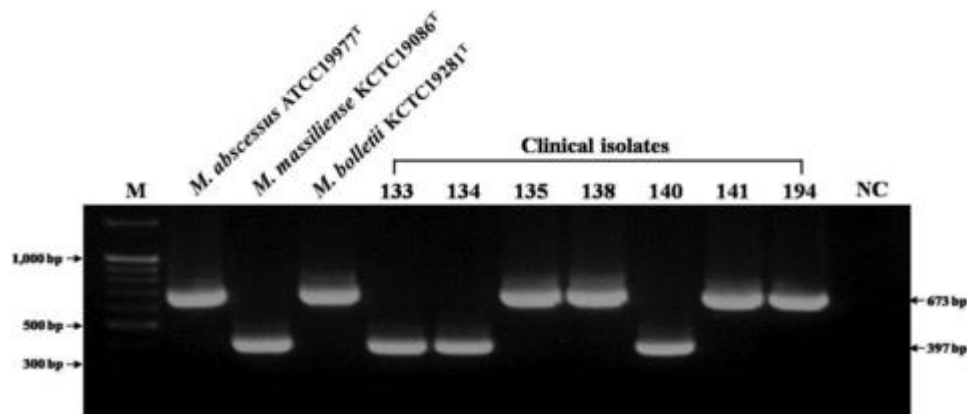
A resazurina é um indicador de oxido-redução utilizado para avaliação da proliferação celular e crescimento bacteriano (Mann e Markham, 1998). A técnica *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) foi recomendada em 2009 pela Organização Mundial da Saúde para testar a suscetibilidade em *M. tuberculosis* (WHO, 2009).

Carvalho e col. (2016) ao avaliar o uso da resazurina na CIM para *M. abscessus*, encontraram uma concordância de 100% entre as leituras visual e com resazurina, o que mostra alta especificidade e sensibilidade, evidenciando que o uso de resazurina não afeta os valores de CIM, apenas torna a leitura mais evidente, minimizando possíveis erros de leitura.

1.5.8 Detecção genotípica da resistência por PCR convencional

Até 2008, a distinção entre *M. a. abscessus* e *M. a. massiliense* dependia da análise de sequências de genes de manutenção (*rpoB* e *hsp65*) (Kim et al., 2007; Kim et al., 2008).

Pelo fato de *M. a. massiliense* demonstrar respostas diferentes em comparação a *M. a. abscessus* contra claritromicina (Kim et al., 2008), Kim e col., em um estudo publicado em 2010, procuraram mais informações sobre a relevância do gene *erm(41)* para o padrão de suscetibilidade a claritromicina por meio de comparações da CIM para claritromicina com uma simples PCR convencional (Figura 8).



Fonte : Kim et al., 2010.

Figura 8. Produtos de *M. a. abscessus*, *M. a. bolletii* e *M. a. massiliense* amplificados do gene *erm*(41) por PCR convencional. As amplificações de DNA do gene *erm*(41) de *M. a. massiliense* tanto da cepa de referência KCTC 19086 como dos isolados 133, 134, e 140 são menores (397 bp) do que as amplificações de *M. a. abscessus* ATCC 19977 e dos isolados 135, 138, e 141, bem como de *M. a. bolletii* KCTC 19281 e do isolado 194 (673 pb). M, marcador de DNA de 100 pb; NC, controle negativo.

É possível observar que os produtos de PCR amplificados utilizando o DNA dos isolados de referência para *M. a. abscessus* e *M. a. bolletii* tiveram um comprimento de 673 pares de base (pb). No entanto, as amplificações para o gene *erm*(41) a partir de isolados de *M. a. massiliense* foram muito menores (397 pb) do que os das outras duas subespécies. Como resultado, *M. a. massiliense* pode ser facilmente diferenciado de *M. a. abscessus* e *M. a. bolletii* com base na análise de PCR do *erm*(41). Esses achados foram consistentemente observados em todos os isolados clínicos avaliados nos estudos de Kim e col. (2010) e Carvalho e col. (2018), nos quais todas as cepas de *M. a. massiliense* foram claramente diferenciadas de *M. a. abscessus* e *M. a. bolletii*.

1.5.9 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada por Zhu e col. (2015) para diferenciar isolados com deleção nos nucleotídeos 159 a 432 do gene *erm*(41), que resulta em sensibilidade a claritromicina. Os autores mostraram elevada taxa de concordância (90,8%) com os testes fenotípicos de suscetibilidade.

Da mesma forma, Shallom e col. (2015) desenvolveram um ensaio para detecção do polimorfismo T28C, da deleção do gene *erm*(41) e da mutação pontual no gene *rrl*. O ensaio foi desenhado de forma a ser realizado em duas partes, uma vez que o mesmo fluoróforo (*SYBR Green*) foi utilizado para detecção, e este corante, que é um intercalante de DNA, é capaz de detectar apenas um alvo, não sendo indicado para métodos multiplex. Os autores concluíram que esta estratégia diagnóstica, que leva apenas três horas para ser realizada, resulte em uma significativa redução no tempo quando comparada a CIM com incubação de 14 dias.

Rocchetti e col. (2017) desenvolveram um teste rápido de identificação para as espécies do complexo *M. fortuitum*, *M. chelonae* e grupo *M. abscessus*, mostrando que a detecção precoce do agente etiológico é fundamental para o estabelecimento da terapêutica correta. No entanto, este método ainda não foi utilizado para detecção de genes de resistência dos referidos microrganismos.

Atualmente, os testes são desenvolvidos para identificação das espécies ou detecção da resistência, não existindo nenhum teste que permita o completo diagnóstico, ou seja, identificação e detecção de resistência em uma mesma plataforma.

O único teste que colocou o diagnóstico completo em uma fita foi a empresa *Hain Lifescience GmbH* (Germany), na qual Mougari e col. (2017) elaboraram um teste rápido que se mostrou sensível e específico, capaz de identificar espécies de MNT do grupo *M. abscessus* e Complexo *M. avium*, assim como a detecção de mutações que conferem resistência a macrolídeos e aminoglicosídeos nos genes *erm*(41), *rrl* e *rrs*, o qual chamaram de NTM-DR.

Em um laboratório de diagnóstico, os testes devem ser rápidos e precisos, com o menor custo possível. Testes que envolvam diversas etapas e dependam de pessoal especializado, tornam-se complexos, podendo não só levar à inserção de erros no processo como também elevar o custo do diagnóstico, fazendo com que esse teste seja acessível a uma porção muito seleta da população afetada pela doença.

Para o desenvolvimento de uma técnica de PCR em tempo real que detecte mais de um gene alvo, como os de identificação e também de resistência, ou seja, multiplex, são utilizados sinalizadores moleculares chamados de sondas de hibridização (TaqMan[®]). Essa técnica confere maior sensibilidade e especificidade para determinar a ausência ou presença de sequências específicas reduzindo significativamente o aparecimento de falso-positivos que comumente aparecem em uma reação em tempo real.

Portanto, o desenvolvimento de um teste molecular e sensível que diminua drasticamente a espera do diagnóstico pelo médico e paciente e forneça os dados de suscetibilidade ou resistência a claritromicina ajuda a iniciar precocemente um tratamento e melhorar o prognóstico destes indivíduos, visto que a técnica atualmente atualizada (CIM) demora 14 dias para ser executada, descontando ainda, o tempo necessário para o recebimento e identificação da espécie antes de incluí-la no teste de suscetibilidade.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Padronização de teste de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de resistência induzida [gene *erm*(41)] do grupo *M. abscessus* à claritromicina.

2.2 Objetivos específicos

1. Utilizar um alvo conhecidamente eficiente na detecção de resistência induzida [gene *erm*(41)] do grupo *M. abscessus* por meio do polimorfismo T28C.
2. Identificar os isolados pela técnica de sequenciamento dos genes *rpoB* e *hsp65*;
3. Identificar mutações nos genes *erm*(41) e *rrl* pelo método de sequenciamento de Sanger;
4. Analisar as sequências do gene *erm*(41) das subespécies de *M. abscessus* para desenhar primers e probes com parâmetros adequados para uma reação de PCR em tempo real;
5. Obter o perfil de suscetibilidade dos isolados por meio da microdiluição em caldo. Montar um painel de isolados de micobactérias com identificação e perfil de suscetibilidade conhecidos para testar na padronização;
6. Avaliar a detecção de resistência do grupo *M. abscessus* utilizando a reação de PCR em tempo real em isolados clínicos;

7. Avaliar a sensibilidade e especificidade da reação de PCR em tempo real em comparação com o método fenotípico;

3. Material e Métodos

3.1 Isolados estudados

Foram utilizados para o presente estudo os isolados de origem pulmonar e extrapulmonar, encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) para identificação de espécie no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2012, identificados pela técnica PRA-*hsp65* como *M. abscessus* tipo 1 ou 2 (Chimara et al., 2008).

3.2 Manutenção dos isolados

Foram realizados estoques de todos os isolados, inoculando uma alçada de crescimento bacteriano em criotubo contendo 500 µl de meio Sauton com glicerol a 10% e miçangas de vidro. Após sedimentação, o excesso de meio foi retirado com auxílio de pipeta Pasteur descartável estéril e os criotubos foram mantidos a $-20^{\circ}\text{C} \pm 1$ (Giampaglia et al., 2009).

A reativação destes isolados estocados foi realizada retirando 1-2 miçangas de cada criotubo e inoculando-as em tubo contendo o meio sólido Lowenstein Jensen (LJ). As miçangas foram estriadas por toda a superfície do meio com auxílio de alça bacteriológica no intuito de obter bom crescimento bacteriano. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por sete dias. Os isolados que não apresentaram crescimento bacteriano após sete dias foram enriquecidos com caldo 7H9 e reincubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ para novo repique em meio LJ.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados para todas as reações de PCR e sequenciamento foi realizada adicionando uma alçada de crescimento bacteriano, a partir do meio de LJ, em 500 µl de tampão TET (Tris 10 mM,

EDTA 1 mM, Triton X-100 1%) e mantendo os tubos por 20 minutos a 95°C em banho seco. Os tubos foram armazenados a $-20^{\circ}\text{C} \pm 1$ até o momento de utilização (Chimara et al., 2008).

3.4 PCR convencional

A presença das deleções no gene *erm*(41) (2pb, nucleotídeos 64-65; 274 pb, nucleotídeos 159 a 432) foi detectada pela amplificação por PCR convencional utilizando o protocolo de Brown-Elliot e col. (2015) e modificado por Carvalho e col. (2017) com os primers *ermF* (5'-GACCGGGGCCTTCTTCGTGAT-3') e *ermR1* (5'-GACTTCCCCGCACCGATTCC-3'), ambos na concentração de 20 pmol.

Para a reação foram utilizados 5,5 µl de água ultrapura preparada *in house*; 1 µl de primer *ermF* (Invitrogen); 1 µl de primer *ermR1* (Invitrogen) e 12,5 µl de Taq *Hot Start Mastermix* (DNA Express).

A amplificação ocorreu no equipamento Mastercycler® nexus (Eppendorf) nas seguintes condições: 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos; um ciclo de 95°C por dois minutos; em seguida mais 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos e um ciclo final de 95°C por dois minutos.

O produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) por 60 min a 100 V para verificação de amplificação (esperado: banda com 673pb, presença de deleção: 397pb). Para confecção do gel de agarose foi utilizado tampão TBE produzido *in house* e para a corrida eletroforética foram utilizados 1,5 µl de marcador de peso molecular de 100 pares de base (Avati); 1,0 µl de corante de arraste produzido *in house* e 0,8 µl de amplicon. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio para visualização das bandas.

3.5 Teste de suscetibilidade fenotípico a claritromicina

O protocolo do teste de suscetibilidade foi baseado no método de concentração inibitória mínima (CIM), recomendado pelo CLSI (2018) e modificado por Carvalho e col. (2016).

Os isolados reativados foram testados contra o fármaco claritromicina. A primeira leitura do teste foi realizada com três dias. Para a segunda leitura, o tempo de incubação foi estendido até 14 dias para verificação da presença de mecanismo de resistência induzida.

A configuração das placas foi desenhada para testar uma amostra em cada linha da placa (Figura 7), contudo os isolados foram testados em duplicata, sendo uma linha para revelação com o corante vital resazurina no terceiro dia e outra para revelação com 14 dias, totalizando quatro isolados por placa. Cada linha conteve três orifícios de controle de crescimento bacteriano sem fármaco (CC) e um orifício de controle de meio (CM), sem fármaco e sem inóculo.

Soluções estoques de claritromicina (Merck) na concentração de 1% (10.000 µg/ml) foram preparadas em água destilada estéril (alíquotas no volume de 100 µl para cada criotubo) e armazenadas a $-20^{\circ}\text{C} \pm 1$.

O preparo das placas contendo claritromicina foi realizado com cálculos para lotes de nove placas por vez.

Foram dispensados 100 µl de caldo Mueller Hinton cátion ajustado (MH) (BD) em todos os orifícios de todas as placas.

Para o lote de nove placas, dois criotubos da solução estoque de claritromicina foram suficientes para o descongelamento e uso.

A partir da solução estoque de claritromicina, foram preparadas nove soluções de trabalho, uma para cada placa a ser confeccionada, contendo 974,4 µl de caldo MH e 25,6 µl da solução estoque descongelada de claritromicina a 1%.

Foram dispensados 100 µl da solução de trabalho na fileira 1 de cada placa e após homogeneizar três vezes com pipeta multicanal, 100 µl foram passados para a fileira 2, após homogeneizar duas vezes, 100 µl foram passados para a fileira 3 e assim sucessivamente até a fileira 8, que possui a menor concentração do fármaco. Após o preparo das placas, as mesmas foram embaladas e armazenadas a $-20^{\circ}\text{C} \pm 1$ até o momento de uso.

O inóculo de bactérias foi preparado a partir do crescimento de três dias em caldo MH. Para o preparo da suspensão, foram adicionadas cerca de três gotas do crescimento bacteriano em tubos contendo 3 ml de caldo MH estéril até atingir a densidade ótica da escala 0,5 de McFarland, medida em espectrofotômetro (Celm, Brasil) sob o comprimento de onda de 625 nm e com absorbância entre 0,08 e 0,10.

Após o preparo da suspensão, 300 µl desta foi diluído em um novo tubo contendo também 3 ml de MH, e a partir desta diluição, 1000 µl foram retirados para uma última diluição em um tubo contendo 9ml de MH. Este último tubo foi vertido em placa de Petri ou canaleta autoclavada e com auxílio de uma pipeta multicanal, 100 µl do inóculo foi colocado em cada orifício contendo fármaco (fileiras 1 - 8), e em três orifícios adicionais (fileiras 9 – 11), sem fármaco, para controle positivo (CC). Cada isolado foi inoculado em duas linhas da placa. As placas tiveram todas as suas identificações cobertas com fita adesiva durex para que não fossem apagadas com o longo tempo de incubação, foram tampadas, colocadas em sacos plásticos para evitar evaporação e ressecamento do meio, armazenadas em caixa de vedação e incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 14 dias. No terceiro dia de incubação, foi realizada leitura visual e na sequência, foi adicionada a solução de resazurina apenas na primeira linha de cada isolado. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e nova leitura foi feita em 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a segunda linha no 14º dia. Os resultados das leituras com e sem resazurina foram comparados tanto no terceiro, como no 14º dia.

A qualidade da cultura foi controlada, semeando duas gotas do inóculo em placa de ágar sangue. Se detectada contaminação ou mais de uma espécie de micobactéria, a placa correspondente era descartada e o teste repetido.

A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada para controle de qualidade de cada lote de placas preparado com fármaco (CLSI, 2018).

De acordo com o manual CLSI (2018), são considerados sensíveis os isolados que apresentarem CIM igual ou inferior a 2 µg/ml, intermediários aqueles que apresentarem CIM igual a 4 µg/ml e resistentes aqueles que apresentarem CIM igual ou superior a 8 µg/ml. Os isolados com sensibilidade no terceiro dia e resistência após o quinto dia são considerados resistentes induzidos.

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

Figura 9. Esquema representativo da organização das placas de CIM e as concentrações finais de claritromicina em cada orifício em µg/ml. CC= controle de crescimento (controle positivo); CM= controle de meio (controle negativo).

3.6 Sequenciamento do gene *rpoB*

Os isolados identificados pelo PRA-*hsp65* como *M. abscessus* tipo 1 e *M. abscessus* tipo 2 (Chimara et al., 2008), foram submetidos ao sequenciamento

do gene *rpoB*. O sequenciamento do gene *rpoB* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Adekambi e col. (2003), para amplificação e análise de um fragmento da região V de 764 pb. Para a reação de PCR foi utilizado 1 µl do primer Myco F (5'- GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3') e 1 µl do primer Myco R (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3') ambos na concentração de 20 pmol; 5,5 µl de água ultrapura preparada *in house*; 12,5 µl de Taq *Hot Start Mastermix* (DNA Express) e 5 µl do DNA bacteriano. A PCR foi feita sob as seguintes condições: 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos. A extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos.

A amplificação de DNA foi evidenciada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Avati) por 60min a 100 V com tampão TBE produzido *in house*; 1,5 µl de marcador de peso molecular de 100 pares de base (Avati); 1,0 µl de corante de arraste produzido *in house* e 1,5µl de amplicon e corado com Brometo de Etídeo por 15 minutos.

O produto de PCR foi purificado utilizando 2 µl da enzima ExoSAP-ITTM Express (Applied BiosystemsTM) e quantificado no espectrofotômetro NanoDropTM One/One^C Microvolume UV-Vis (Thermo ScientificTM) com 1,2 µl do produto. A dosagem de DNA utilizada foi entre 50 e 100 ng/µl, para os ajustes destas concentrações os produtos de PCR purificados foram diluídos com água Milli-Q estéril *in house*.

Na segunda reação de PCR, o kit BigDyeTM Terminator v3.1 (Applied BiosystemsTM) foi utilizado para sequenciar as fitas direta e reversa de cada isolado separadamente. Para esta reação os primers MycoF e MycoR foram ajustados para uma concentração de 1,6 µM e 0,5 µl de cada primer foi utilizado em reações separadas que continham 2,25 µl de água Milli Q estéril (*in house*), 0,75 µl de Buffer 5X presente no kit e 0,5 µl do reagente BigDyeTM Terminator v3.1. Foi adicionado 4 µl desta mistura em cada orifício da placa MicroAmpTM Optical 96-Wells Reaction Plate N8010560 (Applied BiosystemsTM) com 1 µl de

DNA purificado e dosado entre 50 e 100 ng/ μ l. A placa foi selada com o adesivo Optical Adhesives Covers (Applied Biosystems) e protegida de luz com papel alumínio. A reação foi realizada com as seguintes condições: 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por cinco segundos e 60 °C por quatro minutos no equipamento Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™).

A segunda purificação dos produtos foi feita com o kit BigDye XTerminator™ (Applied Biosystems™). Antes de iniciar a purificação, a placa contendo os produtos de PCR foi centrifugada por um minuto, conforme recomenda o protocolo do kit. Em seguida, 5 μ l de água Milli Q estéril (*in house*) foram adicionados em cada orifício no intuito de completar 10 μ l de volume. Para cada amostra foram adicionados 45 μ l de solução SAM presente no kit e 10 μ l de Xterminator. Por sua rápida sedimentação, foram preparados 12 tubos contendo 405 μ l de solução SAM em cada um deles e numerados de 1 a 12 para serem utilizados em cada uma das fileiras da placa. Em cada um dos 12 tubos foi adicionado 90 μ l de X terminator à solução SAM somente no momento de preencher a respectiva fileira. Por se tratar de uma solução viscosa, o Xterminator foi levado à agitação em vórtex por dois minutos antes de dar início à purificação e novamente por 10 segundos antes de ser misturado a cada um dos respectivos tubos com solução SAM. Foram adicionados 55 μ l da mistura SAM/Xterminator em cada orifício da placa. Cada um dos 12 tubos abastecia oito orifícios (uma fileira de A-H), por isso os tubos eram homogeneizados em vórtex entre as pipetagens sempre que necessário e as pipetas eram trocadas para cada orifício. A placa foi levada ao agitador (Analítica) em velocidade máxima por 30 minutos – a velocidade máxima para o suporte de placas é diferente da velocidade máxima para tubos. A placa foi centrifugada por um minuto a 1.000 rpm e armazenadas a -20°C até o momento de inserção no sequenciador 3.500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems™).

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.6.1 e utilizando a

ferramenta BLAST: Basic Local Alignment Search Tool > Nucleotide BLAST. As sequências foram analisadas por homologia ao banco de sequências GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e foram consideradas as espécies com 100% de similaridade.

3.7 Sequenciamento do gene *rrl*

Os isolados foram submetidos a amplificação do gene *rrl* utilizando os primers SP1 5'-CCTGCACGAATGGCGTAACG e SP2 5'-CACCAGAGGTTCGTCCGTC (Maurer et al., 2012). Para a reação foram utilizados 5,5 µl de água ultrapura preparada *in house*, 12,5 µl de Taq Hot Start Mastermix (DNA Express), 1 µl de cada primer na concentração de 20 pmol e 5 µl de DNA. A PCR foi realizada no equipamento Mastercycler® nexus (Eppendorf) nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 60 seg, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação de DNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Avati) por 60min a 100 V. Para confecção do gel foi utilizado tampão TBE produzido *in house*. Foram adicionados 1,5 µl de marcador de peso molecular de 100 pares de base (Avati), 1,0 µl de corante de arraste produzido *in house* e 1,5 µl do produto de PCR. Após o término da eletroforese o gel foi corado com Brometo de Etídeo por 15 minutos.

As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito para o sequenciamento do gene *rpoB*.

As sequências foram analisadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.6.1. Para identificar mutações no gene *rrl*, as sequências foram comparadas ao genoma de *M. abscessus* (Genbank número NC_010397.1). Esta cepa, que não apresenta mutação, possui uma adenina na posição 2058, que confere perfil sensível a claritromicina.

3.8 Sequenciamento do gene *erm*(41)

A amplificação inicial do gene *erm*(41) e o sequenciamento foram realizados utilizando os primers *ermF* (5' GACCGGGGCCTTCTTCGTGAT 3') e *ermR1* (5' GACTTCCCCGCACCGATTCC 3'), nas condições descritas acima em 3.4 PCR convencional.

As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito para o sequenciamento do gene *rpoB*.

As sequências foram analisadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.6.1.

As sequências estudadas do gene *erm*(41) foram comparadas à sequência de *M. abscessus* MAB30 (Genbank nº EU590129). Esta cepa apresenta como mutação uma citosina na posição 28 que confere perfil sensível a claritromicina.

3.9 Sequenciamento do gene *hsp65*

A amplificação inicial do gene *hsp65* e o sequenciamento de Sanger foram realizados utilizando os primers HSPF3 (5' – ATCGCCAAGGAGATC GAGCT – 3 ') e HSPR4 (5' – AAGGTGCCGCGGATCTTGTT – 3') nas concentrações de 20pmol e 1,6 µM, respectivamente.

A amplificação ocorreu no equipamento Mastercycler® nexus (Eppendorf) nas seguintes condições: 30 ciclos de 60s a 95°C, 45s a 2 ° C e 90s a 72°C, seguidos de uma extensão final por 5 min a 72°C.

A amplificação de DNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Avati) por 60min a 100 V. Para confecção do gel foi utilizado tampão TBE produzido *in house*. Foi adicionado 1,5 µl de marcador de peso molecular de 100 pares de base (Avati), 1,0 µl de corante de arraste produzido

in house e 1,0 µl do produto de PCR. Após o término da eletroforese o gel foi corado com Brometo de Etídeo por 15 minutos.

As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito para o sequenciamento do gene *rpoB*.

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.6.1 e utilizando a ferramenta BLAST: Basic Local Alignment Search Tool > Nucleotide BLAST. As sequências foram analisadas por homologia ao banco de sequências GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e foram consideradas as espécies com 100% de similaridade.

3.10 PCR em tempo real

Com o objetivo de detectar e discriminar os alelos C ou T entre os isolados testados, foi customizado um ensaio personalizado ANAAH46 EU590129 Custom Taqman Genotyping Assay (433207) VIC/FAM (Thermofisher Scientific) por meio da sequência EU590129 (Genbank), cujo polimorfismo foi marcado, e submetido de acordo com o “Tutorial de Submissão de Sequências para Ensaio Customizado Taqman de Discriminação Alélica” de 2014 cedido pelo centro de treinamento da empresa no site: <https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/genotyping/>.

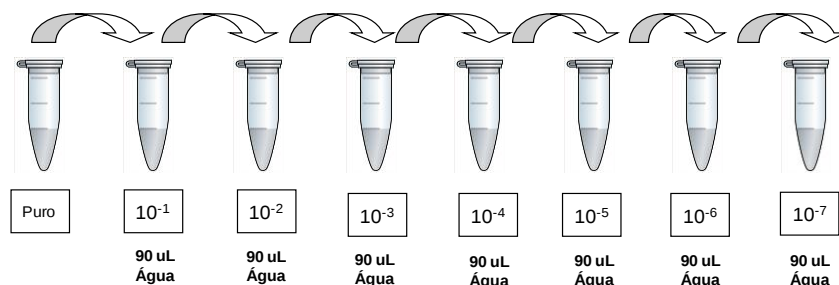
A mistura customizada de SNP Taqman continha os primers F (5'-GTGTCCGGCCAACGGT – 3'), R (5'-CCAGTCATCAGTGAGCGGATA – 3') e as sondas 1 (5' - CAGCCCC[G]CTGGCGT - 3') para detecção do alelo 1 (C) marcado com VIC e 2 (5' - CAGCCCC[A]CTGGCGT - 3') para detecção do alelo 2 (T) marcado com FAM. Foram utilizados 0,5 ul desta mistura na concentração de 20X juntamente com 5,0 ul de MasterMix TaqPath™ ProAmp™ Multiplex MasterMix A32705 (Applied Biosystems™) e 2,5 ul de água Milli-Q estéril *in house*. A reação ocorreu no equipamento ABI 7500 Fast (Applied

Biosystems™) nas seguintes condições: 5 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C.

Um controle positivo foi adicionado a cada reação para assegurar que os sinais produzidos após a PCR fossem verdadeiros/específicos. Para este controle positivo foi utilizada a cepa padrão *M. abscessus* ATCC 19977 com uma turbidez de 1,0 na escala de McFarland. Foram utilizados 5µl da suspensão bacteriana para um volume final da reação de 25µl. O controle positivo foi o último a ser incluído na placa de reação.

Controles contendo todos os componentes da reação, exceto DNA, foram incluídos nas reações de PCR para controle de contaminação das salas utilizadas para pré-PCR e adição de DNA, sendo realizado um controle para cada sala trabalhada. Para estes controles de área, foi adicionada água no lugar de DNA.

O limite mínimo de detecção (LMD) é a menor quantidade de DNA necessária para a detecção dos genes alvos. Este limite foi obtido por meio de diluições seriadas do DNA em água ultrapura. A partir da concentração de 10 ng/µl, o qual chamamos de “puro”, o DNA foi diluído sete vezes em água no fator 10. Para estas diluições, 10 µl da solução mais concentrada foram acrescentados a 90 µl de água, obtendo a diluição 10^{-1} . Assim, 10µl da diluição 10^{-1} mais 90µl de água ultrapura é igual a diluição 10^{-2} e assim sucessivamente até a diluição 10^{-7} (Figura 10).



Fonte: Protocolo cedido gentilmente pelo laboratório de meningites bacterianas do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

Figura 10. Esquema representativo das diluições seriadas no fator 10.

Para a avaliação do LMD na reação de qPCR foram adicionados 2 µl de cada uma das diluições em triplicata. A concentração final destas diluições na reação foram de 20 ng, 2 ng, 200 pg (0,2 ng), 20 pg (0,02 ng), 2 pg (0,002 ng), 200 fg (0,0002 ng), 20 fg (0,00002 ng) e 2 fg (0,000002 ng), como mostra o quadro 3.

Quadro 4. Esquema de concentrações obtidas na diluição seriada e concentrações finais adicionadas na reação de qPCR para avaliação do LMD.

Diluição	concentração de DNA	mistura		adicionado na reação	concentração final na reação
		DNA	água		
Puro	10 ng/µL	-	-	2 µL	20 ng
10 ⁻¹	1 ng/µL	10 µL (puro)	90 µL	2 µL	2 ng
10 ⁻²	100 pg/uL (0,1ng/µL)	10 µL (10 ⁻¹)	90 µL	2 µL	200 pg (0,2 ng)
10 ⁻³	10 pg/uL (0,01 ng/µL)	10 µL (10 ⁻²)	90 µL	2 µL	20 pg (0,02 ng)
10 ⁻⁴	1 pg/uL (0,001 ng/µL)	10 µL (10 ⁻³)	90 µL	2 µL	2 pg (0,002 ng)
10 ⁻⁵	100 fg/uL (0,0001ng/µL)	10 µL (10 ⁻⁴)	90 µL	2 µL	200 fg (0,0002 ng)
10 ⁻⁶	10 fg/uL(0,00001 ng/µL)	10 µL (10 ⁻⁵)	90 µL	2 µL	20 fg (0,00002 ng)
10 ⁻⁷	1 fg/uL (0,000001ng/µL)	10 µL (10 ⁻⁶)	90 µL	2 µL	2 fg (0,000002 ng)

Fonte: Protocolo cedido gentilmente pelo laboratório de meningites bacterianas do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

Para avaliação do LMD foram levados em consideração os seguintes parâmetros: “slope”, que mensura a exatidão no momento das diluições e tem como valor de referência -3,1 a -3,6, sendo o ideal 3.3. “R²”, que avalia pipetagem e homogeneidade por meio da diferença entre as triplicatas de mesma concentração, o valor de referência deve ser próximo a 1. E “eficiência”, que possui valores de referência de 90 – 110% para detecção de alvo único e 80 – 120% para multiplex, sendo o último utilizado neste estudo.

Uma vez encontrado os respectivos valores de LMD para detecção dos alelos T28 e C28, o teste de “repetitividade 95%” foi realizado, o qual é direcionado para padronizações que serão utilizadas para diagnóstico. No teste de repetitividade, a diluição que representa o LMD é adicionada em uma placa de 96 poços inteira e a detecção de DNA deve estar viável em 95% da placa. Neste estudo foi realizado um teste de repetitividade tanto para a última diluição cujo DNA foi detectável (LMD) como para diluição anterior ao LMD.

4. Resultados

4.1 Isolados

Foram selecionados 260 isolados dos quais 81 foram recebidos no ano de 2010, 77 em 2011 e 102 em 2012. Estes isolados foram identificados na rotina laboratorial como *M. abscessus* tipo 1 (n=173) e tipo 2 (n=87).

No entanto, somente 207 estavam viáveis para análise, devido a contaminações ou ausência de crescimento bacteriano após repique em meio LJ ou meio MHC. Dos isolados viáveis para a realização dos testes, 135 eram *M. abscessus* tipo 1 e 72 eram *M. abscessus* tipo 2.

4.2 Identificação de espécies

A identificação das espécies foi realizada pelo sequenciamento dos genes *rpoB* e *hsp65*, que revelaram discordância na identificação de sete isolados (3,38%) (Tabela 1). Dentre estes isolados, quatro foram identificados como pertencentes à subespécie *M. a. massiliense* no sequenciamento do gene *hsp65* e *M. a. bolletii* no sequenciamento do gene *rpoB*. Contudo, se mantiveram concordantes com o método fenotípico de identificação, PRA-*hsp65*, o qual identificou os quatro isolados como *M. abscessus* tipo 2.

Os três isolados discordantes restantes foram identificados como *M. a. bolletii* no sequenciamento do gene *hsp65* e *M. a. abscessus* no sequenciamento do gene *rpoB*, sendo discordantes também em relação ao método PRA-*hsp65* de identificação, no qual apresentaram um perfil de *M. abscessus* tipo 2.

Os demais isolados (n=200) foram concordantes para os dois genes sequenciados, sendo divididos em: *M. a. abscessus* (n=133; 66,5%), *M. a. bolletii* (n=34; 17,0%) e *M. a. massiliense* (n=33; 16,5 %)

Um isolado, apesar de concordante entre ambos os genes utilizados na técnica de sequenciamento, apresentou discordância em relação à técnica PRA-*hsp65*. O isolado foi identificado como *M. a. massiliense* no sequenciamento de *hsp65* e *rpoB*. Contudo, apresentou um perfil de restrição compatível com *M. abscessus* tipo 1 no método PRA-*hsp65*.

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos em todas as técnicas realizadas no estudo.

fragmento <i>erm(41)</i>	n	qPCR	sequenciamento				PRA <i>hsp65</i>	CLA
			<i>erm(41)</i>	<i>rrl</i>	<i>hsp65</i>	<i>rpoB</i>		
397pb (n=36)	30	T	T	A	M mas	M mas	tipo 2	S
	1	T	T	A	M mas	M mas	tipo 1	S
	2	T	T	A	M mas	M bo	tipo 2	S
	1	T	T	A	M mas	M mas	tipo 2	RI
	2	T	T	A	M ab	M ab	tipo 1	S
673pb (n=171)	112	T	T	A	M ab	M ab	tipo 1	RI
	31	T	T	A	M bo	M bo	tipo 2	RI
	10	C	C	A	M ab	M ab	tipo 1	S
	5	T	T	A	M ab	M ab	tipo 1	S
	3	T	T	A	M bo	M bo	tipo 2	S
	1	T	T	A	M mas	M bo	tipo 2	S
	4	T	T	A	M ab	M ab	tipo 1	R
	3	T	T	A	M bo	M ab	tipo 2	RI
	1	T	T	A	M mas	M bo	tipo 2	RI
	1	T	T	A	M mas	M mas	tipo 2	RI

M ab: *M. a. abscessus*; M bo: *M. a. bolletii*; M mas: *M. a. massiliense*; CLA: categoria de suscetibilidade após teste a claritromicina com 14 dias de incubação; S: sensível; R: resistente; RI: resistente intermediário.

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

O sequenciamento dos genes *erm(41)* e *rrl* foi realizado para todos os isolados do estudo. A Tabela 1 apresenta a comparação entre o perfil genético dos isolados e o perfil de suscetibilidade a claritromicina após 14 dias.

Dos 207 isolados estudados, todos foram selvagens para o gene *rrl*.

Para o gene *erm*(41), 197 isolados apresentaram o genótipo T28 e 10 apresentaram o genótipo C28.

Para 36 isolados foram detectadas deleções no gene *erm*(41), a saber, 2 pb, nucleotídeos 64-65, e 274 pb, nucleotídeos 159 a 432. Entre os 36 isolados, dois pertenciam à subespécie *M. a. abscessus* e o restante foi identificado como *M. a. massiliense* pelo sequenciamento do gene *hsp65* (sendo um deles identificado como *M. a. bolletii* no sequenciamento do gene *rpoB*, já citado na discordância entre os métodos de identificação).

Dos 171 isolados que apresentaram o fragmento íntegro, um foi identificado como *M. a. massiliense* no sequenciamento de ambos os genes, sendo o restante pertencente às subespécies *M. a. abscessus* (n=134) e *M. a. bolletii* (n=36) no sequenciamento do gene *rpoB*. Entre os 134 isolados *M. a. abscessus*, um foi identificado como *M. a. bolletii* pelo sequenciamento do gene *hsp65* e entre os 36 isolados *M. a. bolletii*, um foi identificado como *M. a. massiliense* pelo sequenciamento do gene *hsp65*, ambos já citados anteriormente como discordante entre os métodos de identificação.

Na comparação dos perfis genéticos com o perfil de suscetibilidade foram encontrados 10 isolados com resultados discordantes (4,83%). Estas discordâncias ocorreram em duas situações: nove isolados sensíveis com fragmento íntegro e gene *erm*(41) selvagem (T28) e um isolado, identificado como *M. a. massiliense*, com deleção (397 pb) e resistência induzida.

A técnica de sequenciamento dos quatro genes estudados, *rpoB*, *hsp65*, *erm*(41) e *rrl* teve um tempo de execução de uma semana para cada gene devido ao N de 207 isolados do estudo. Para cada um dos quatro genes foram utilizadas cerca de quatro placas e meia de sequenciamento, estas 18 placas cheias tiveram um tempo de corrida em equipamento de Sanger de 12h cada uma. A técnica de sequenciamento resultou em 1.656 sequências para corte e alinhamento e 828 sequências consenso para posterior análise e pesquisa de mutações.

4.4 Teste de suscetibilidade fenotípico a claritromicina

O teste de suscetibilidade à claritromicina foi realizado para os 207 isolados. Após a leitura da CIM no terceiro dia, 200 isolados (96,6%) foram suscetíveis a claritromicina, três isolados (1,4%) foram resistentes intermediários e quatro isolados (2,0%) foram resistentes.

Entre os isolados suscetíveis (n=200) e resistentes intermediários (n=3) à claritromicina, 149 (73,3%) apresentaram resistência induzida no 14º dia de leitura.

A cepa de controle de qualidade (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) apresentou resultado esperado de acordo com o protocolo padrão estabelecido pelo CLSI (2018).

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade a claritromicina após três dias de incubação, conforme subespécie identificada pelo sequenciamento do gene *rpoB*.

Subespécie	N	Suscetibilidade a claritromicina		
		S (%)	I (%)	R (%)
<i>M. a. abscessus</i>	136	130 (95,6)	2 (1,5)	4 (2,9)
<i>M. a. massiliense</i>	33	33 (100)	0	0
<i>M. a. bolletii</i>	38	37 (97,3)	1 (2,7)	0
Total	207	200 (96,7)	3 (1,4)	4 (1,9)

S: suscetível (CIM $\leq$ 2 µg/mL); I: Intermediário (CIM = 4 µg/mL); R: resistente (CIM $\geq$ 8 µg/mL).

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade a claritromicina após 14 dias de incubação, conforme subespécie identificada pelo sequenciamento do gene *rpoB*.

Subespécie	N	Suscetibilidade a claritromicina		
		S (%)	R (%)	RI (%)
<i>M. a. abscessus</i>	136	17 (12,5)	4 (3,0)	115 (84,5)
<i>M. a. massiliense</i>	33	31 (94,0)	0	2 (6,0)
<i>M. a. bolletii</i>	38	6 (15,8)	0	32 (84,2)
Total	207	54 (26,0)	4 (2,0)	149 (72,0)

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

4.5 PCR em tempo real

As amostras positivas para T28 foram representadas pelo fluoróforo FAM gerando uma curva de cor azul (Figura 11).

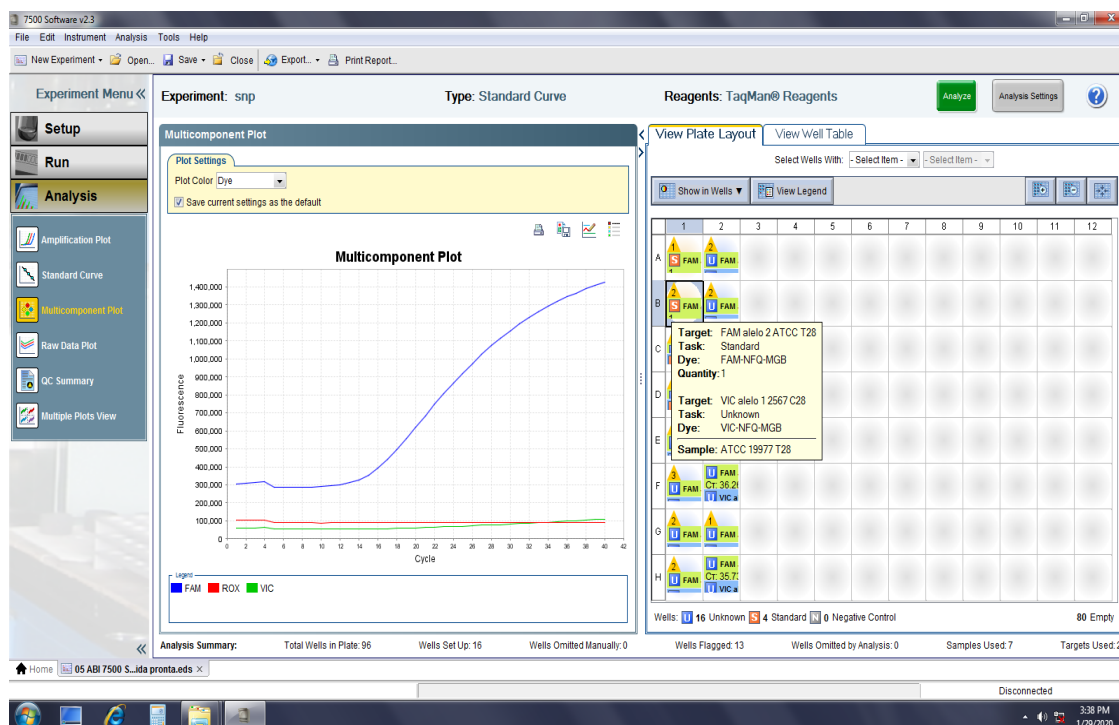


Figura 11. Captura de tela da amplificação gerada no software do equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™). O sinal em azul é representativo da fluorescência por FAM, utilizada para detecção de T28. A curva é observada em “Multicomponent Plot”, no qual, a cepa ATCC 19977 foi utilizada em duplicata como controle positivo para o alelo T28 nos orifícios A1 e B1 da placa de 96 poços.

As amostras positivas para C28 foram representadas pelo fluoróforo VIC gerando uma curva de cor verde (Figura 12).

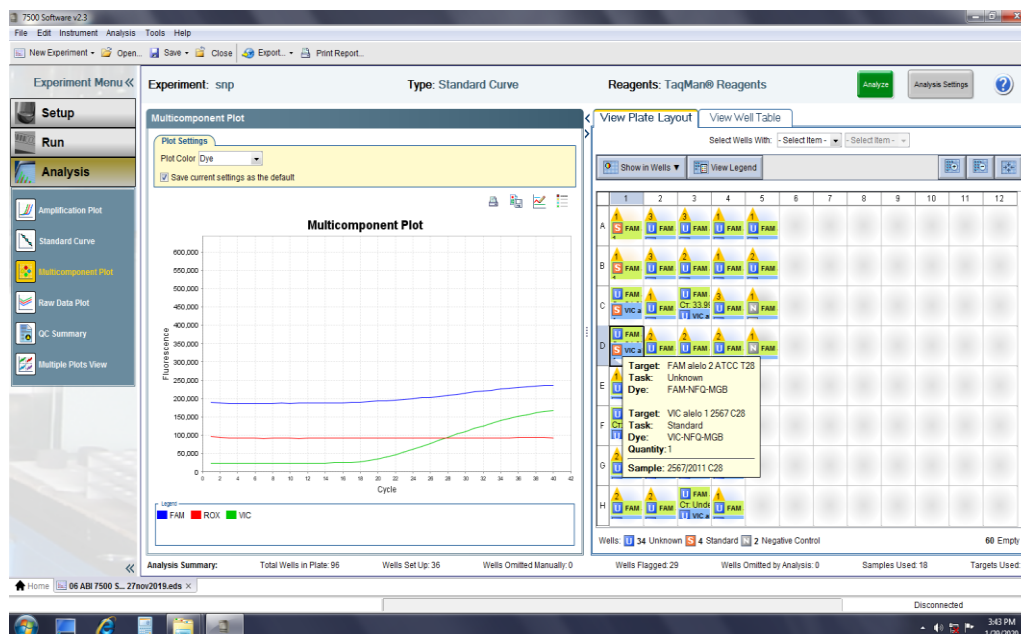


Figura 12. Captura de tela da amplificação gerada no software do equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™). O sinal em verde é representativo da fluorescência por VIC, utilizada para detecção de C28. A curva é observada em “Multicomponent Plot”, no qual, o isolado 2567 do ano de 2011, conhecidamente identificado como portador do alelo C28 pelo sequenciamento do gene *erm* (41) foi utilizado em duplicata como controle positivo para o alelo C28 nos orifícios C1 e D1 da placa de 96 poços.

Foram testados dois isolados representantes de cada uma das seguintes espécies/complexos: Complexo *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. peregrinum* dentre as MCR e Complexo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* e *Nocardia*. Todos os isolados apresentaram resultado negativo com ausência de fluorescência para T ou C.

Controles negativos de reação foram utilizados em duplicata para a qPCR, apresentando resultado negativo em todas as corridas.

Neste estudo, não foi levado em consideração os valores de CT (*cycle threshold*) que comumente são observados na PCR em tempo real.

O valor de CT corresponde ao ciclo no qual foi detectada a fluorescência do alvo, ou seja, é o ciclo exato no qual o produto de amplificação é detectado. Este valor é utilizado para padronizar resultados positivos, diferenciando-os de negativos. O presente estudo teve como objetivo detectar a presença dos alelos T ou C expressados pelo gene *erm* (41).

A concordância de qPCR com o sequenciamento do gene *erm*(41) foi de 100%. A sensibilidade e especificidade de qPCR na genotipagem SNP T28C foi de 100%.

O limite mínimo de detecção (LMD) foi de 200 fg para sonda FAM (detecção de alelo T28) e 2 pg para sonda VIC (detecção de alelo C28), sendo esta última menos sensível em comparação a FAM.

Para o teste de repetitividade, foram utilizadas as concentrações de 200 fg (LMD) e 2 pg (concentração anterior ao LMD) para a sonda FAM (T28). Para ambas as concentrações foi possível detectar o DNA em 100% da placa, ficando estabelecido um LMD de 200 fg para a sonda FAM.

Os parâmetros de LMD encontrados em FAM foram de -3,169 para slope; 0,964 para R^2 e 106,784 de especificidade. Todos os resultados obtidos estavam dentro dos valores de referência.

Para o teste de repetitividade da sonda VIC (C28) foram utilizadas as concentrações de 2 pg (LMD) e 20 pg (anterior ao LMD), sendo esta última detectável em 95% da placa. A concentração de 2 pg foi detectável em 50% da placa, sendo estabelecido, portanto, um LMD de 20 pg para a sonda VIC.

Os parâmetros de LMD encontrados em VIC foram de -3,681 para slope; 0,999 para R^2 e 86,918 para especificidade. Todos os resultados obtidos estavam dentro dos valores de referência.

Este protocolo de qPCR teve um tempo de execução de duas horas, sendo uma hora para o preparo da reação em placa e adição de DNA e uma hora de corrida em equipamento. Para os 207 isolados do estudo foram utilizadas cinco placas (não incluindo as placas utilizadas para padronização como especificidade com outras MNTs e Complexo *M. tuberculosis*, LMD e teste de repetitividade 95%).

5. Discussão

Como o número de antibióticos ativos contra o grupo *M. abscessus* é muito limitado, é preciso saber se a claritromicina possui atividade, mesmo em regimes combinados, para o tratamento de isolados exibindo resistência induzida. A comparação da eficácia *in vivo* e dados de suscetibilidade *in vitro* precisa ser feita. É por isso que Bastian e col. (2011) propõem que a suscetibilidade à claritromicina seja avaliada numa base molecular para todos os novos casos de infecções pelo grupo *M. abscessus* e que os resultados da terapia com claritromicina sejam observados. É sugerido que em primeiro lugar seja realizado um PCR abrangendo *erm*(41) para detectar a deleção observada em *M. a. massiliense*. Em segundo lugar, o sequenciamento de um fragmento de DNA do gene *erm*(41) de modo a poder detectar o polimorfismo T / C no nucleotídeo 28 e a busca da região *rrl* envolvida na resistência para mutações específicas. Os dados resultantes serão utilizados para determinar espécies (*M. a. abscessus*, *M. a. bolletii* e *M. a. massiliense*) dentro do grupo *M. abscessus*, avaliar a suscetibilidade à claritromicina e orientar tratamento.

Com os resultados obtidos neste estudo, é possível manter o algoritmo proposto por Bastian e col. (2011). No entanto, torna-se possível detectar o polimorfismo T28C por PCR em tempo real no lugar do sequenciamento, diminuindo o custo e o tempo de detecção.

O presente trabalho desenvolveu uma qPCR para detecção do polimorfismo T28C para ser incorporado na rotina diagnóstica, diminuindo o tempo de obtenção dos resultados. A técnica de sequenciamento neste estudo demorou dez dias para ser realizada, sendo o primeiro dia destinado à amplificação dos isolados por PCR convencional, corridas eletroforéticas e purificação com enzima; o segundo dia para dosagem de DNA em equipamento e diluições para atingir a concentração adequada; o terceiro dia para o preparo de placas e reação de Big Dye e o quarto dia para segunda purificação e corrida de 12h. Os demais dias são destinados aos cortes, alinhamento e

longas análises em softwares específicos de sequenciamento, para finalmente chegar à detecção de mutações. O tempo para execução e análise do sequenciamento está diretamente ligado ao número de amostras, visto que é uma técnica que dobra este N no momento em que as placas são feitas separadamente para sequências forward e reverse. Cada uma das longas etapas necessita de reagentes caros e a corrida geralmente é feita por um funcionário encarregado específico para esta ação, sendo a segunda purificação realizada apenas no dia da corrida da respectiva placa. No protocolo da qPCR uma placa de 96 orifícios é lida em uma hora e o procedimento total é realizado entre 2 a 3h, dependendo da quantidade de amostras. Uma vez corrida a placa em equipamento, a cor da curva, azul ou verde no caso deste ensaio, define se trata de um alelo T ou C. Para esta análise não há necessidade de conhecimento específico em softwares de alinhamento, visto que a detecção das esperadas mutações é prontamente diferenciável.

As qPCR disponíveis na literatura geralmente são desenvolvidas para a identificação do grupo *M. abscessus*, diferenciando-o de outras micobactérias (Keerthirathne et al., 2016; Rocchetti et al., 2017) ou para identificação das subespécies dentro do grupo (Kim et al., 2015). O único estudo que fez uma qPCR para a detecção do SNP T28C e mutações em *rrl* foi Shallom e col. (2015). No entanto, os autores utilizaram a metodologia de SYBR®-Green, intercalante que não é utilizado em ensaios multiplex. Dessa forma, as reações são feitas separadas e a interpretação dos resultados é dada pelas mudanças de temperatura na análise das curvas de fusão. A proposta deste estudo foi de realizar uma qPCR com sondas Taqman para detecção do SNP T28C de maneira prática, com fácil interpretação dos resultados e minimizando as chances de erro, no intuito de otimizar a rotina laboratorial, e que seja possível adicionar outros alvos futuramente (multiplex).

O CLSI (2018) recomenda que o sequenciamento do gene *rpoB* seja utilizado para identificar as subespécies do grupo *M. abscessus*, no entanto, este estudo mostrou divergência entre sete isolados (3,38%) identificados pelo

sequenciamento do gene *rpoB* em comparação com a identificação realizada pelo sequenciamento do gene *hsp65*.

O estudo de Kim e col. (2017) atribuiu estas discordâncias entre as subespécies à transferência lateral de genes, no qual, foram identificados seis isolados de *M. a. massiliense* com o gene *rpoB* recombinante transferido lateralmente de *M. a. abscessus*.

O estudo de Kim e col. (2019) foi o primeiro a relatar a transferência lateral de genes em *hsp65* para isolados do grupo *M. abscessus*, no qual dois isolados de *M. a. massiliense* tiveram o gene *hsp65* recombinante transferido lateralmente de cepas de *M. a. abscessus*, sugerindo que existe um potencial de identificação incorreta quando o protocolo baseado em *hsp65* é utilizado para identificação de micobactérias (Kim et al., 2019)

Sapriel e col. (2016) por meio da técnica de MLST e sequenciamento de genoma completo chegaram à conclusão de que as três subespécies de *M. abscessus* fazem uma extensa troca alélica, resultando em cepas misturadas. Essas linhagens foram associadas a pacientes portadores de fibrose cística ou colonização crônica. Além disso, dados da análise do sequenciamento de genoma completo destas linhagens sugeriram que a evolução do grupo *M. abscessus* é pontuada esporadicamente por eventos de remodelação em todo o genoma. O estudo mostrou que metade do conteúdo genômico destas linhagens foi remodelado e uma das cepas adquiriu um lócus que confere resistência induzida aos macrolídeos.

Apesar de ser considerado referência para identificação de bactérias, o gene 16S rRNA apresenta poucas variações nucleotídicas entre as espécies do gênero *Mycobacterium*, levando à necessidade de utilização de outros alvos mais variáveis. Não existe um ponto de corte para o número mínimo de diferenças de nucleotídeos que indique uma taxa de distinção entre as espécies de micobactérias (Tortoli et al., 2003), por este motivo este alvo não foi utilizado para a determinação das três subespécies deste estudo.

Dada a discordância entre os métodos mais utilizados para identificação destas subespécies e a falta de correlação entre a subespécie e seu perfil de suscetibilidade neste estudo, a aplicação da técnica de sequenciamento de genoma completo se faz necessária para estes isolados em estudos futuros, que é uma limitação do presente estudo.

Este estudo tem como limitação também a não elucidação de outros mecanismos de resistência além dos mediados pelos genes *rrl* e *erm*(41). Os quatro isolados resistentes no CIM desde o terceiro dia de leitura não apresentaram mutação em *rrl* que justifique esta resistência, podendo ser investigados, em estudos futuros, outros mecanismos de resistência presentes nestes isolados, como por exemplo, bomba de efluxo. No estudo de Li e col. (2020) todos os isolados do grupo *M. abscessus* que apresentaram resistência adquirida não possuíam mutação em *rrl*, mas sim mecanismos relacionados a bombas de efluxo. Semelhantemente, no estudo de Carneiro e col. (2017) todos os 42 isolados do grupo *M. abscessus* apresentaram resistência adquirida à claritromicina no terceiro dia de leitura, no entanto, nenhum deles apresentou mutação em *rrl*.

A PCR convencional para detecção da deleção no gene *erm*(41) em isolados do grupo *M. abscessus* já vem sendo realizada na rotina laboratorial do Instituto Adolfo Lutz há alguns anos. Existem no mercado métodos comerciais que não incluem estas deleções de 2 pb e 297 pb no diagnóstico, estabelecendo que um isolado identificado como *M. a. massiliense* pelo gene *rpoB* é automaticamente considerado suscetível à claritromicina, como é o caso do GenoType NTM-DR® (Hain Lifescience). Este estudo mostra que a associação entre a subespécie *M. a. massiliense* à suscetibilidade a claritromicina pode ser errônea, uma vez que dois isolados presentes neste estudo não tiveram este resultado esperado. Os dois isolados foram identificados pelo sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpoB* como *M. a. massiliense* e apresentaram um perfil de resistência induzida à claritromicina no 14º dia de leitura do método fenotípico, sendo um dos isolados carreador do

gene *erm*(41) íntegro (673 pb) e o outro com deleção presente (397 pb). Sendo este último, um resultado discordante não elucidado, provavelmente associado a outro mecanismo de resistência induzida, mecanismo este, não expressado pelo gene *erm*(41), visto que se apresenta afuncional. Ananta e col. (2018) também encontraram um isolado de *M. a. massiliense* (dentre os 37 isolados desta subespécie no estudo) com deleção em *erm*(41) presente e fenótipo de resistência induzida à claritromicina, mecanismo este que, assim como no presente estudo, não foi elucidado. Além do isolado resistente induzido, dos 37 isolados *M. a. massiliense*, oito apresentaram resistência adquirida à claritromicina.

No presente estudo, nenhum isolado identificado como *M. a. massiliense* apresentou resistência adquirida à claritromicina. Embora seja um fenótipo incomum, há relatos na literatura em maior quantidade em comparação à resistência induzida à claritromicina, que é muito mais difícil de ser encontrada devido a deleção no gene *erm*(41) que torna o mecanismo de RI afuncional. No estudo de Cho e col. (2019) foi realizada uma investigação retrospectiva de isolados do grupo *M. abscessus* de 2011 a 2016. Dos 269 *M. a. massiliense* presentes no estudo, 17 apresentaram resistência adquirida à claritromicina, mas nenhum deles apresentou resistência induzida. Do mesmo modo, no estudo de Carneiro e col. (2017) todos os 14 *M. a. massiliense* estudados apresentavam deleção e resistência adquirida à claritromicina, no entanto, nenhum apresentou resistência induzida.

Foi descrita recentemente a sequência do genoma de um isolado de *M. a. massiliense* (Myco1POA) identificado como um novo tipo de sequência (ST262) com mutações ainda não relatadas na literatura, que podem levar a resistência à claritromicina. Os autores colocam que a descrição de um novo ST indica a escassez de estudos moleculares para este grupo de microrganismos ou realmente o surgimento de um novo ST de *M. a. massiliense* com múltiplas mutações e resistência aos antimicrobianos (Carneiro et al., 2020).

Os isolados de *M. a. massiliense* que demonstraram fenótipo de resistência induzida no presente estudo também podem estar associados à transferência lateral de genes demonstrada pelos estudos de Kim e col. (2017) e Kim e col. (2019) citados anteriormente. A hipótese de que os genes *rpoB* e *hsp65* podem ter sido transferidos lateralmente explicaria o fato deste isolado resistente induzido identificado como *M. a. massiliense* no sequenciamento de ambos os genes. Dados como estes mostram a importância da inclusão da detecção de deleção no gene *erm(41)* em testes diagnósticos multiplex (baseados em qPCR) em estudos posteriores.

Este estudo mostra, portanto, que não basta uma investigação apenas em nível de subespécie, para orientar o tratamento correto é necessário ter conhecimento do perfil de suscetibilidade para os isolados, fenotípico e principalmente genotípico.

6. Conclusões

- O ensaio Taqman de PCR em tempo real mostrou alta sensibilidade e especificidade em comparação aos demais métodos devido ao terceiro oligonucleotídeo, ou seja, a sonda específica para a detecção do polimorfismo T28C.
- Todos os genótipos fornecidos pela qPCR estavam de acordo com o sequenciamento, sendo este considerado o padrão ouro.
- Além dos ganhos no processamento da amostra, como menor chance de erros e de contaminação, a qPCR apresentou ganhos como menor tempo de reação e fácil interpretação dos resultados, mostrando ser uma boa ferramenta para a rotina do laboratório.
- A identificação dos isolados do grupo *M. abscessus* em nível de subespécie não é suficiente para orientar o tratamento correto, uma vez que foram observadas subespécies com perfis de suscetibilidade que são considerados característicos de outra subespécie. Sendo assim, é necessária a execução do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos para ter conhecimento do perfil de suscetibilidade de cada isolado, independente de sua subespécie.
- Os dados obtidos neste estudo mostram a necessidade de estudos posteriores que dêem continuidade à investigação do grupo *M. abscessus* e melhore o diagnóstico, podendo lançar mão de técnicas como sequenciamento de genoma completo, pesquisa de outros mecanismos de resistência como bomba de efluxo e uma qPCR multiplex que inclua a detecção de deleção no gene *erm*(41).

7. Referências Bibliográficas

Adékambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J ClinMicrobiol 2003; 41: 5699–5708.

Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D, Drancourt M. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. J ClinMicrobiol 2004; 42: 5493–501.

Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bollettii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56 (1): 133–143.

Adékambi T, Drancourt M. *Mycobacterium bollettii* respiratory infections. Emerg Infect Dis 2009; 15: 302–305.

Adjemian J, Olivier K, Seitz A, Holland S, Prevots R. Prevalence of pulmonar nontuberculous mycobacterial infections among U.S. Medicare beneficiaries, 1997–2007. Am J Respir Crit Care Med 2012; 185: 881-886.

Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli, MR. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecie *massiliense* in a lung transplant and cystic fibrosis center. Am J Respir Crit Care Med 2012;185:231–232.

Akshay S, Berteau M, Hobbie SN, Oettinghaus B, Shcherbakov D, Böttger EC, Akbergenov R. Phylogenetic sequence variations in bacterial rRNA affect species-specific susceptibility to drugs targeting protein synthesis. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 4096–4102.

Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceyssens PJ, Coll P, Corcoran D et al. How to: identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2018; 24 (6): 599-603.

American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) was adopted by the ATS Board of Directors, September 2006, and by the IDSA Board of Directors, January 2007.

Analssie EJ, Penzak SR, Digma C. The hospital water supply as a source of nosocomial infections. *Arch. Intern. Med* 2002; 162: 1483 – 1492.

Ananta P, Kham-Ngam I, Chetchotisakd P, Chaimanee P, Reechaipichitkul W, Namwat W, Lulitanond V, Faksri K. Analysis of drug-susceptibility patterns and gene sequences associated with clarithromycin and amikacin resistance in serial *Mycobacterium abscessus* isolates from clinical specimens from Northeast Thailand. *Plos One* 2018; 13: e0208053.

Ashford DA, Kellerman S, Yakrus M, Brin S, Good RC, Fineli L, Jarvis WR, McNeil MM. Pseudo-outbreak of septicaemia due to rapidly growing mycobacteria associated with extrinsic contamination of culture supplement. *J. Clin. Microbiol* 1997; 35: 2040 – 2042.

Aubry A, Jarlier V, Escolano S, Truffot-Pernot C, Cambau E. Antibiotic susceptibility pattern of *Mycobacterium marinum*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; 44: 3133 – 3136.

Bailey M, Chettiath T, Mankin AS. Induction of *erm(C)* expression by noninducing antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (3): 866 – 874.

Ballarino GJ, Olivier KN, Claypool RJ, Holland SM, Prevots DR. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: antibiotic treatment and associated costs. *Respir. Med.* 2009; 103:1448–1455.

Bar-On O, Mussaffi H, Mei-Zahav M, Prais D, Steuer G, Stafler P, Hananya S, Blau H. Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. *JCyst Fibros* 2015; 14: 53–62.

Bastian S, Veziris N, Roux AL, 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: 775–81.

Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, Small PM. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. Lancet 1999; 353:444 - 449.

Bicmen C, Gunduz AT, Coskun M, Senol G, Cirak AK, Ozsoz A. Molecular detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four clinically important nontuberculous mycobacterial species in smear-negative clinical samples by the genotype mycobacteria direct test. J Clin Microbiol 2011; 49:2874 - 2878.

Billinger ME, Olivier KN, Viboud C, de Oca RM, Steiner C, Holland SM, Prevots DR. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998–2005. Emerg Infect Dis 2009;15:1562–1569.

Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, Schluger NW, Saiman L. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. Emerg Infect Dis 2008;14:390–396.

Bonicke, R. The occurrence of atypical mycobacteria in the environment of man and the animal. Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis. 1966; 37:361–368.

Bosne-David S, Barros V, Verde SC, Portugal C, David HL. Intrinsic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to clarithromycin is effectively reversed by subinhibitory concentrations of cell wall inhibitors. J. Antimicrob. Chemother 2000;46:391–395.

Bottger EC, Springer B, Prammananan T, Kidan Y, Sander P. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. EMBO Rep 2001; 2: 318–23.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1.ed. Brasília, 2008a. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf > Acesso em fev/2019.

Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Ver Biochem 1995; 64: 29–63.

Brito, A. C. Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em saúde pública. 86 páginas. Tese (doutorado). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 2008.

Brown BA, Wallace RJ Jr, Onyi GO, Rosas VD, Wallace RJ. Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *M. chelonae*-like organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 180–4.

Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:716–746.

Brown-Elliott BA, Vasireddy S, Vasireddy R, Iakhiaeva E, Parodi N, Strong A, Gee M, McNulty S, O’Neil S, Wallace RJ, Jr. Sequencing of the *erm* gene in isolates of *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* with low clarithromycin MICs, abstr 945. Abstr 114th Gen Meet Am Soc Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2014.

Brown-Elliott BA, Vasireddy S, Vasireddy R, Iakhiaeva E, Howard ST, Nash K, Parodi N, Strong A, Gee M, Smith T, Wallace RJ, Jr. Utility of sequencing the *erm*(41) gene in isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* with low and intermediate clarithromycin MICs. *J Clin Microbiol* 2015; 53:1211–1215.

Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, Reacher M, Haworth CS, Curran MD, Harris SR, Peacock SJ, Parkhill J, Floto RA. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2013;381:1551–1560.

Buriankova K, Doucet-Populaire F, Dorson O, Gondran A, Ghnassia J, Weiser J, Pernodet J. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:143–150.

Burman WJ, Stone BL, Brown BA, Wallace RJ Jr, Böttger EC. AIDS-related *Mycobacterium kansasii* infection with initial resistance to clarithromycin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31:369–371.

Burns DN, Wallace RJ Jr, Schultz ME, Zhang YS, Zubairi SQ, Pang YJ, Gibert CL, Noe ES, Gordin FM. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. Am Rev Respir Dis 1991; 144:1153–1159.

Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy C, Delchier J, Megraud F. Evaluation of a new test, Genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2009; 47:3600–3607.

Cardoso AM, Sousa EMD, Viana-Niero C, Bortoli FBD, Neves ZCPD, Leão SC, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. Microbes Infect 2008;10:1552–1557.

Carneiro MDS, Lima-Morales D, Crispim MN, Nunes LDS, Barth AL. Novel mutations in the resistome of a new sequence type (ST262) of clarithromycin resistant *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. Journal Of Global Antimicrobial Resistance 2020; 21: 294-295.

Carneiro MDS, Nunes LS, David SMM, Barth AL. Lack of association between *rrl* and *erm*(41) mutations and clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus* complex. Mem Inst Oswaldo Cruz 2017; 112(11): 775-778.

Carvalho NFG. Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Mycobacterium abscessus* quando ao perfil de resistência à claritromicina. [Dissertação]. São Paulo: Programa de Pós-graduação em ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2014.

Carvalho NFG, Pavan F, Sato DN, Leite CQF, Arbeit RD, 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.

Castilho AL, Caleffi-Ferracioli KR, Canezin PH, Siqueira VLD, Scodro RBDL, Cardoso RF. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. J Microbiol Methods 2015;111:119–121.

CF Foundation Patient Registry. Annual Data Report to Center Directors 2010. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation, 2011.

Chan ED, Kong PM, Fennelly K, Dwyer AP, Iseman MD. Vertebral osteomyelitis due to infection with nontuberculous *Mycobacterium* species after blunt trauma to the back: three examples of the principle of locus minoris resistentia. Clin Infect Dis 2001; 31: 1506–1510.

Chan ED, Bai X, Kartalija M, Orme IM, Ordway DJ. Host immune response to rapidly growing mycobacteria, an emerging cause of chronic lung disease. Am J Respir Cell Mol Biol 2010; 43: 387–393.

Cheng A, Liu YC, Chen ML, Hung CC, Tsai YT, Sheng WH, Liao CH, Hsueh PR, Chen YC, Shang SC. Extrapulmonary infections caused by a dominant strain of *Mycobacterium massiliense* (*Mycobacterium abscessus* subspecies *bolletii*). Clin Microbiol Infect 2013;19:E473–E482.

Cheng A, Sheng WH, Huang YC, Sun HY, Tsai YT, Chen ML, Liu YC, Chuang YC, Huang SC, Chang CI, Chang LY, Huang WC, Hsueh PR, Hung CC, Chen YC, Chang SC. Prolonged postprocedural outbreak of *Mycobacterium massiliense* infections associated with ultrasound transmission gel. Clin Microbiol Infect 2016;22:382.e1–382.e11.

Chernenko SM, Humar A, Hutcheon M, Chow C, Chaparro C, Keshavjee S, Singer LG. *Mycobacterium abscessus* infections in lung transplant recipients: the international experience. J Heart Lung Transplant 2006; 25:1447–55.

Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leão SC. 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.

Cho EH, Huh HJ, Song DJ, Lee SH, Kim CK, Shin SY, Ki C, Jhun BW, Moon SM, Kwon O. Drug susceptibility patterns of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* isolated from respiratory specimens. Diagnostic Microbiology And Infectious Disease 2019; 93: 107-111.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia and Other Aerobic Actinomycetes: Approved Standard—Second Edition. CLSI document M24-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

Cloud JL, Hoggan K, Belousov E, Cohen S, Brown-Elliott BA, Mann L, Wilson R, Aldous W, Wallace RJ Jr, Woods GL: Use of the MGB Eclipse system and SmartCycler PCR for differentiation of *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus*. J Clin Microbiol 2005; 43: 4205-4207.

Cloud JL, Carroll KC, Cohen S, Anderson CM, Woods GL. Interpretative criteria for use of Accuprobe for identification of *Mycobacterium avium* complex directly from 7H9 broth cultures. J Clin Microbiol 2005; 43: 3474-3478.

Collins CH, Granje HJM, Yates MD. Identification of species. In: Tuberculosis bacteriology: organization and Practice 2nd ed. Oxford: ButterworthHeinemann, 1997. p. 39.

Conn HJ, Dimmick I. Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. Journal of bacteriology 1947; 54(3):291-303.

Cremades R, Santos A, Rodriguez JC, Garcia-Pachón E, Ruiz M, Royo G. *Mycobacterium abscessus* from respiratory isolates: activities of drug combinations. J Infect Chemother 2009;15:46–48.

Cullen RA, Cannon CL, Mark EJ, Colin AA. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? Am J Respir Crit Care Med 2000;161:641–645.

Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicty. Adv Microb Physiol London 1998;39:131-203.

Daley CL, Griffith DE. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. Clin Chest Med 2002; 23:623–32, vii.

Dauendorffer JN, Guillemin I, Aubry A, Truffot-Pernot C, Sougakoff W, Jarlier V, Cambau E. Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. J Clin Microbiol 2003; 41:1311–1315.

Dautzenberg B, Truffot C, Legris S, Meyohas M, Berlie HC, Mercat A, Chevret S, Grosset J. Activity of clarithromycin against *Mycobacterium avium* infection in patients with the acquired immune deficiency syndrome. A controlled clinical trial. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 564–569.

Davidson RM, Hasan NA, de Moura VC, Duarte RS, Jackson M, Strong M. Phylogenomics of Brazilian epidemic isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* reveals relationships of global outbreak strains. *Infect Genet Evol* 2013;20:292–297.

Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR, Riabova O, Makarov V, Pasca MR. *Mycobacterium abscessus*, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients. *Int J Mol Sci* 2019; 20(23):58-68.

De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1756–1763.

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

Devalloi A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2969–2973.

Domenech P, Jimenez MS, Menendez MC, Bull TJ, Samper S, Manrique A, Garcia MJ. *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:535–540.

Duarte RS, Lourenço MC, Fonseca LS, Leão SC, Amorim EL, Rocha ILL et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* 2009;47:2149–2155.

Dubee V, Bernut A, Cortes M, Lesne T, Dorchene D, Lefebvre AL, Hugonnet JE, Gutmann L, Mainardi JL, Herrmann JL, Gaillard J, Kremer L, Arthur M. Beta-lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1051–1058.

Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Garcia-Almeida D, Bodas-Sanchez A, Gadea I, Fernandez-Roblas R. Prevalence of erm methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 919–923.

Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. BMC Microbiol 2008; 8:184.

Esther CR Jr, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2010; 9: 117–23.

Euzéby JP. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium*. <http://www.bacterio.cict.fr/>. 2019

Everall I, Nogueira CL, Bryant JM, Sánchez-Busó L, Chimara E, Duarte RDS, Ramos JP, Lima KVB, Lopes ML, Palaci M, Kipnis A, Monego F, Floto RA, Parkhill J, Leão SC, Harris SR. Genomic epidemiology of a national outbreak of post-surgical *Mycobacterium abscessus* wound infections in Brazil. Microb Genom 2017; 3(5): e000111.

Falkinham III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev Washington 1996; 9: 177-215.

Falkinham JO 3rd: Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. J Appl Microbiol 2009; 107: 356-367.

Falkinham JO. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. Future Microbiol 2010; 5:951–960.

Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, Pace NR. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 16393–16399.

Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann J, Nick JA 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.

Gayathri R, Lily TK, Deepa P, Mangal S, Madhavan HN. Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. J Postgrad Med 2010; 56:76–78.

Gholoobi A, Masoudi-Kazemabad A, Meshkat M, Meshkat Z: Comparison of culture and PCR methods for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in different clinical specimens. Jundishapur J Microbiol 2014; 7:e8939.

Giampaglia CMS, Brito AC, Martins MC, Ueki SY, Latrilha FO, Oliveira RS, Yamauchi JU, da Silva Telles MA. Maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* on glass beads. Ann Clin Lab Sci. 2009;39(1):51-4.

Goodfellow M, Magee GM. "Taxonomy of Mycobacteria" in *Mycobacteria*, eds PA Gangadharam e PA Jenkins (Nova York, NY: Chapman e Hall) 1988; 1-71.

Griffith DE, Brown-Elliott BA, Benwill JL, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium abscessus*. Pleased to meet you, hope you guess my name. Ann Am Thorac Soc 2015; 12: 436–439.

Griffith DE, Brown-Elliott BA, Langsjoen B, Zhang Y, Pan X, Girard Y, Nelson K, Caccitolo J, Alvarez J, Shepherd S, Wilson R. Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. Am J Respir Crit CareMed 2006; 174: 928–934.

Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: an analysis of 154 patients. Am Rev Respir Dis 1993; 147:1271–1278.

Griffith DE. The talking *Mycobacterium abscessus* blues. Clin Infect Dis 2011; 52: 572–574.

Griffith DE, David E, Aksamit TR. Understanding nontuberculous mycobacterial lung disease: it's been a long time coming. F1000research 2016; 5:2797-2804.

Groote MAD, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clin Infect Dis 2006; 42:1756–1763.

Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front. Microbiol* 2018; 9:67.

Guimarães T, Chimara E, Do Prado GV, Ferrazoli L, Carvalho NG, Simeão FCDSS, Souza ARD et al. Pseudoutbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak. *Am J Infect Control* 2016; 44:221–226.

Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, Leitch A, Loebinger MR, Milburn HJ, 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.

Herrera-Léon L, Pozuelo-Díaz R, Moreno TM, Cobacho AV, Vega PS, Pajares MSJ. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2009; 27(9):493-502.

Hofko M, Mischnik A, Kaase M, Zimmermann S, Dalpke AH. Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on the BD Max system. *J Clin Microbiol* 2014; 52:1701-1704.

Hofmann-Thiel S, Turaev L, Alnour T, Drath L, Mullerova M, Hoffmann H. Multi-centre evaluation of the speed-oligo Mycobacteria assay for differentiation of *Mycobacterium* spp. in clinical isolates. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 353

Hogg GG, Schinsky MF, McNeil MM, Lasker BA, Silcox VA, Brown JM. Central line sepsis in a child due to a previously unidentified *Mycobacterium*. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1193–1196.

Honda JR, Hasan NA, Davidson RM, Williams MD, Epperson LE, Reynolds PR, Smith T, Iakhiaeva E, Bankowski MJ, Wallace RJ Jr et al. Environmental Nontuberculous Mycobacteria in the Hawaiian Islands. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: 1–17.

Huang Y, Liu M, Shen G, Lin CF, Kao CC, Liu P, Shi Z. Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing. J Microbiol Immunol Infect 2010; 43:401–406.

Inagaki T, Yagi T, Ichikawa, Nakagawa T, Moriyama M, Uchiya K, Nikai T, Ogawa K. Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in *Mycobacterium avium* complex isolates. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 722–729.

Ingram CW, Tanner DC, Durack DT, Kernodle GW, Corey GR. Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. Clin Infect Dis 1993; 16:463–471.

Iseman MD, Marras TK. The importance of nontuberculous mycobacterial lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2008; 178: 999–1000.

Isenberg, H. D. Clinical microbiology procedures handbook. U ed., Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchell JD, Daley CL. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. Clin Infect Dis 2011; 52: 565–71.

Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous Mycobacterial Infections. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2008; 132: 1333-1341.

Jeon K, Kwon OJ, Lee NY, Kim B, Kook Y, Lee S, Park YK, Kim CK, Koh W. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180:896–902.

Johnson LR. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. J Theor Biol 2008; 251:24–34.

Keerthirathne TP, Magana-Arachchi DN, Madegedara D, Sooriyapathirana SS. Real time PCR for the rapid identification and drug susceptibility of Mycobacteria present in Bronchial washings. BMC Infect Dis 2016; 16: 607-615.

Kim BJ, Lee S, Lyu M, Kim S, Bai G, Kim SJ, Chae G, Kim E, Cha CY, Kook Y. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol 1999; 37:1714–1720.

Kim BJ, Kim GN, Kim BR, Shim TS, Kook YH, Kim BJ. Phylogenetic analysis of *Mycobacterium massiliense* strains having recombinant *rpoB* gene laterally transferred from *Mycobacterium abscessus*. PLoS One 2017; 12(6):e0179237.

Kim BJ, Kim GN, Kim BR, Shim TS, Kook YH, Kim BJ. New *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense* strains with recombinant *hsp65* gene laterally transferred from *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus*: Potential for misidentification of *M. abscessus* strains with the *hsp65*-based method. PLoS ONE 2019; 14(9): e0220312.

Kim HY, Yun YJ, Park CG, Lee DH, Cho YK, Park BJ, Joo SI, Kim EC, Hur YJ, Kim BJ, Kook YH. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. J Clin Microbiol 2007; 45: 3127–30.

Kim HY, Kook Y, Yun YJ, Park CG, Lee NY, Shim TS, Kim B, Kook Y. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae*–*Mycobacterium abscessus* group isolates. J Clin Microbiol 2008; 46: 3384–90.

Kim HY, Kim BJ, Kook Y, Yun Y, Shin JH, Kim B, Kook Y. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. Microbiol Immunol 2010; 54:347–53.

Kim K, Hong S, Kim B, Kim B, Lee S, Kim G, Shim TS, Kook Y, Kim B. Separation of *Mycobacterium abscessus* into subspecies or genotype level by direct application of peptide nucleic acid multi-probe real-time PCR method into sputa samples. BMC Infect Dis 2015; 15: 325-332.

Kim RD, Greenberg DE, Ehrmantraut ME, Guide SV, Ding L, Shea Y, Brown MR, Chernick M, Steagall WK, Glasgow CG et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease: prospective study of a distinct preexisting syndrome. Am J Respir Crit Care Med 2008;178:1066–1074.

Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, Bange FC, Bottger EC. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J Clin Microbiol 1993; 31:2882–2889.

Koh SJ, Song T, Kang YA, Choi JW, Chang KJ, Chu CS, Jeong JG, Lee J, Song M, Sung H, Kang Y, Yim J. An outbreak of skin and soft tissue infection caused by *Mycobacterium abscessus* following acupuncture. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 895–901.

Koh WJ, Jeon K, Lee NY et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183: 405–10.

Konig B, Tammer I, Sollich V, Konig W. Intra and interpatient variability of the *hsp65* and 16S-23S intergenic gene region in *Mycobacterium abscessus* strains from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2015; 43: 3500–3.

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; 42:240–245.

Lai CC, Tan CK, Chou CH, Hsu H, Liao C, Huang Y, Yang P, Luh K, Hsueh P. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2008. Emerg Infect Dis 2010; 16: 294–96.

Lai KK, Brown BA, Westerling JA, Fontecchio SA, Zhang Y, Wallace RJ Jr. Long-term laboratory contamination by *Mycobacterium abscessus* resulting in two pseudo-outbreaks: recognition with the use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1998; 27:169–175.

Leão SC, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, Mejía GI, Telles MADS, Chimara E, Velazco M, Fernandez J, Rodrigues PA, Guerrero MI, León CI, Porras TB, Rastogi N, Goh KS et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in Laboratories from Latin America and the Caribbean. J Microbiol Methods Amsterdam 2005; 193-199.

Leão SC, Tortoli E, Viana-Niero C, Ueki SYM, Lima KVB, Lopes ML, Yubero J, Menendez MC, Garcia MJ. Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of

the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* group is needed. J Clin Microbiol 2009; 47: 2691–2698.

Leão SC, Viana-Niero C, Matsumoto CK, Lima KV, Lopes ML, Palaci M, Hadad DJ, Vinhas S, Duarte RS, Lourenço MCS, Kipnis A, Neves ZCD, Gabardo BMA, Ribeiro MO, Baethgen L, Assis DBD, Madalosso G, Chimara E, Dalcolmo MP. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. Future Microbiol 2010; 5:971–980.

Leão SC, Tortoli E, Euzéby JP, Garcia MJ. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. Int J Syst Evol Microbiol 2011; 61:2311–2313.

Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002; 34: 482–92.

Lee SH, Yoo HK, Kim SH, Koh WJ, Kim CK, Park YK, Kim HJ. The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea. Ann Lab Med 2014; 34:31–37.

Lefebvre AL, Le Moigne V, Bernut A, Veckerle C, Compain F, Herrmann JL, Kremer L, Arthur M, Mainardi JL. Inhibition of the β -lactamase Bla_{Mab} by avibactam improves the *in vitro* and *in vivo* efficacy of imipenem against *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61:e02440-16.

Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, Aviram M, Rivlin J, Picard E, Lavy A, Yahav Y, Rahav G. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. Emerg Infect Dis 2008; 14:378–84.

Levy-Frebault V, Grimont F, Grimont P, David H. Deoxyribonucleic acid relatedness study of the *Mycobacterium fortuitum*-*Mycobacterium chelonae* complex. Int J Syst Bacteriol 1986; 36:458–460.

Lewis JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? Clin Infect Dis 2005; 40:280–285.

Li B, Guo Q, Mao Y, Zou Y, Zhang Y, Zhang Z, Chu H. Genetic Evolution of *Mycobacterium abscessus* Conferring Clarithromycin Resistance during Long-Term Antibiotic Therapy. Canadian Respiratory Journal 2020;1-7.

Liu M, Douthwaite S. Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1629–33.

Lopeman RC, Harrison J, Desai M, Cox JAG. *Mycobacterium abscessus*: Environmental Bacterium Turned Clinical Nightmare. Microorganisms 2019; 7(3):2-17.

Lopez-Marin LM, Lanelle MA, Prome D, Daffe M. Structures of the glycopeptidolipid antigens of two animal pathogens: *Mycobacterium senegalense* and *Mycobacterium porcinum*. Eur J Biochem 1993; 215:859–866.

Lorena NS, Pitombo MB, Côrtes PB, Maya MC, Silva MG, Silva ACD et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. Acta Cir Bras 2010; 25:455–459.

Lyu J, Jang HJ, Song JW, Choi C, Oh Y, Lee SD, Kim WS, Kim DS, Shim DS. Outcomes in patients with *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease treated with long-term injectable drugs. Respir Med 2011; 105:781–787.

Macheras E, Roux A, Ripoll F, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Gaillard J, Heym B. Inaccuracy of single-target sequencing for discriminating species of the *Mycobacterium abscessus* group. J Clin Microbiol 2009; 47:2596–2600.

Macheras E, Roux AL, Bastian S, Leão SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Richter E, Rusch-Guerdes S, Pfyffer G, Bodmer T, Cambau E, Gaillard J, Heym B. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. J Clin Microbiol 2011; 49:491–499.

Madsen CT, Jakobsen L, Buriankova K, Doucet-Populaire F, Pernodet J, Douthwaite S. Methyltransferase *erm*(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 2005; 280:38942–38947.

Madsen CT, Jakobsen L, Douthwaite S. *Mycobacterium smegmatis erm*(38) is a reluctant dimethyltransferase. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:3803–3809.

Magee, GM e Ward, AC (2012). “Genus I. *Mycobacterium* Lehmann e Neumann 1896, 363^{AL}”, no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 5, *Actinobacteria*, eds M. Goodfellow, P. Kampfer, HJ Busse, ME Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig e W. Whitman (Nova Iorque, NY: Springer), 312-375.

Maloney S, Weibel S, Daves B, Adams K, Becker S, Bland L, Arduino M, Wallace R Jr, Zhang Y, Buck G, Risch P, Jarvis W. *Mycobacterium abscessus* Pseudoinfection Traced to an Automated Endoscope Washer: Utility of Epidemiologic and Laboratory Investigation. The Journal of Infectious Diseases 1994; 169(5): 1166–1169.

Mangione EJ, Huitt G, Lenaway D, Beebe J, Bailey A, Figoski M, Rau MP, Albrecht KD, Yakrus MA. Nontuberculous mycobacterial disease following hot tub exposure. Emerg Infect Dis 2001;7:1039–1042.

Mann CM, Markham JL. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. J App Microbiol 1998; 84:538–544.

Maravic G, Feder M, Pongor S, Flogel M, Bujnicki JM. Mutational analysis defines the roles of conserved amino acid residues in the predicted catalytic pocket of the rRNA:m⁶A methyltransferase ErmC'. J Mol Biol 2003; 332:99–109.

Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: Rapid, simple and inexpensive method. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:3616–3619.

Martin A, Morcillo N, Lemus D, Montoro E, Telles DS, Simboli MA 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; 9:901–906.

Matsumoto CK, Chimara E, Bombarda S, Duarte RS, Leão SC. Diversity of pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Mycobacterium abscessus* type 2 clinical isolates. J Clin Microbiol 2011; 49:62–68.

Maurer FP, R uegger V, Ritter C, Bloemberg GV, B ottger EC. Acquisition of clarithromycin resistance mutations in the 23S rRNA gene of *Mycobacterium abscessus* in the presence of inducible erm(41). J Antimicrob Chemother 2012; 67:2606–2611.

Maxson S, Schutze G, Jacobs R. *Mycobacterium abscessus* osteomyelitis: treatment with clarithromycin. Infect Dis Clin Pract 1994; 3: 203–204

McGrath EE, Blades Z, McCabe J, Jarry H, Anderson PB. Nontuberculosis mycobacteria and the lung: From suspicion to treatment. *Lung* 2010; 188:269–282.

Meier A, Heifets L, Wallace RJ Jr, Zhang Y, Brown BA, Sander P, Bottger EC. Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium*: observation of multiple 23S rDNA mutations in a clonal population. J Infect Dis 1996; 174.

Meier A, Heifets L, Wallace RJ, Jr, Zhang Y, Brown BA, Sander P, Böttger EC. Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium*: observation of multiple 23S rDNA mutations in a clonal population. J Infect Dis 1996; 174:354–360.

Meier A, Kirschner P, Springer B, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ Jr, Bottger EC. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:381–384.

Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*, p.399–437. In P. R. Murray EJ, Baron MA, Pfaller FC, Tenover, Tenover YC, Tenover RH (ed.), *Manual of clinical microbiology* 1999, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Meyers H, Brown-Elliot BA, Moore D, Curry J, Truong C, Zhang Y, Wallace JR Jr. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. Clin Infect Dis 2002; 34:1500–1507.

Mirsaeidi M, Machado RF, Garcia JG, Schraufnagel DE. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: a population-based comparative study. PLoS One 2014; 9: e91879.

Monego F, Duarte RS, Nakatani SM, Araújo WN, Riediger IN, Brockelt S et al. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. Braz J Infect Dis 2011;15:436–441.

Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. 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; 55:500–505.

Moore M, Frerichs JB. 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: 133–69.

Mougari F, Loiseau J, Veziris N, Bernard C, Bercot B, Sougakoff W, Jarlier V, Raskine L, Cambau E. Evaluation of the new GenoType NTM-DR kit for the molecular detection of antimicrobial resistance in non-tuberculous mycobacteria. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy 2017; (72)6: 1669-1677.

Mushatt DM, Witzig RS. Successful treatment of *Mycobacterium abscessus* infections with multidrug regimens containing clarithromycin. Clin Infect Dis 1995; 20:1441–1442.

Nash KA, Inderlied CB. Genetic basis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* isolated from patients with disseminated disease. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:2625–2630.

Nash KA, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. J. Antimicrob. Chemother 2005; 55:170–177.

Nash KA, Andini N, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:3476–3478.

Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1367-1376.

Nathavitharana RR, Strnad L, Lederer PA, Shah M, Hurtado RM. Top Questions in the Diagnosis and Treatment of Pulmonary *M. abscessus* Disease. *Open Forum Infectious Diseases* Oxford 2019; 6(7):1-5.

Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:810-818.

Nguyen L, Thompson CJ. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: The mycobacteria paradigm. *Trends Microbiol* 2006; 14: 304–312.

Nunes S, Baethgen LF, Ribeiro MO, Cardoso CM, De Paris F, David SMMD, Silva MGD, Duarte RS, Barth AL. Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in southern Brazil: persistence of a single clone from 2007 to 2011. *J Med Microbiol* 2014; 63:1288–1293.

Okazaki A, Takato H, Ohkura N, Katayama N, Kasahara K, Fujimura M. Successful treatment with chemotherapy and corticosteroids of pulmonary *Mycobacterium abscessus* infection accompanied by pleural effusion. *J Infect Chemother* 2013; 19: 964–968.

Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ Jr, Faiz AR, Lee J, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards L. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 828–834.

Olivier KN, Weber DJ, Lee JH, Handler A, Tudor G, Molina PL, Tomashefski J, Knowles MR. Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 835–840.

Omar SV, Roth A, Ismail NA, Erasmus L, Ehlers M, Kock M, Paulse N, Said HM, Hoosen AA, Reischl U. Analytical performance of the Roche LightCycler

Mycobacterium Detection Kit for the diagnosis of clinically important mycobacterial species. PLoS One 2011; 6:e24789.

O'Neill MB, Mortimer TD, Pepperell CS: Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* across evolutionary scales. PLoS Pathog 2015; 11:e1005257.

Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Studer S, Vachiery JL, Glanville AR et al. International Guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update - a consensus report from the pulmonary scientific council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant 2006; 25: 745–755.

Padilla EV, González JM, Manterola A, Pérez MD, Quesada S, Gordillo C, Vilaplana MA, Pallarés S, Molinos MD, Sánchez, Ausina V. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA *Mycobacteria* and Genotype *Mycobacterium* assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains J. Clin. Microbiol. 2004; 42:3083-3088.

Padoveze MC, Fortaleza CM, Freire MP, Assis DBD, Madalosso G, Pellini ACG, César MLV, Neto VP, Beltramelli MM, Chimara E, Ferrazoli L, Telles MADS, Sampaio JLM, Leão SC. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. J Hosp Infect 2007; 67:161–167.

Palomino JC, 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; 46:2720–2722.

Park IK, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. Semin Respir Crit Care Med 2015; 36: 217–24.

Park S, Kim S, Park EM, Kim H, Kwon OJ, Chang CL, Lew WJ, Park YK, Koh WJ. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea. J. Korean Med Sci 2008; 23:49–52.

Perez AA, Singer JP, Schwartz BS, Chin-Hong P, Shah RJ, Kleinhenz ME et al. Management and clinical outcomes after lung transplantation in patients with

pre-transplant *Mycobacterium abscessus* infection: a single center experience. Transpl Infect Dis 2019; 29:e13084.

Petrini B. *Mycobacterium abscessus*: An emerging rapid-growing potential pathogen. APMIS 2006; 114:319–328.

Pfister P, Corti N, Hobbie S, Bruell C, Zarivach R, Yonath A, Bottger EC. 23S rRNA base pair 2057–2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A_G. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 5180–5185.

Pfister P, Jenni S, Poehlsgaard J, Thomas A, Douthwaite S, Ban N, Bottger EC. The structural basis of macrolide-ribosome binding assessed using mutagenesis of 23S rRNA positions 2058 and 2059. J Mol Biol 2004; 342: 1569–1581.

Pillet S, Verhoeven PO, Epercieux A, Bourlet T, Pozzetto B. Development and validation of a laboratory-developed multiplex real-time PCR assay on the BD Max System for detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA in various clinical specimens. J Clin Microbiol 2015; 53:1921-1926.

Pinhata JMW, Novella MCC, Carmo AMS, Silva RRF, Ferrazoli L, Sacchi CT, Oliveira RS. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by real-time PCR in sputum samples and its use in the routine diagnosis in a reference laboratory. J Med Microbiol 2015; 64: 1040-1045.

Poehlsgaard J, Douthwaite S. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. Curr Opin Investig Drugs 2003; 4: 140–148.

Poehlsgaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. Nat Rev Microbiol 2005; 3: 870–880.

Prammananan T, Sander P, Brown BA, Frischkorn K, Onyi GO, Zhang Y, Bottger EC, Wallace RJ Jr. 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: 1573–1581.

Prevots DR, Shaw PA, Strickland D, Jackson LA, Raebel MA, Blosky MA, Montes de Oca R, Shea YR, Seitz AE, Holland SM, Olivier KN. Nontuberculous

mycobacterial lung disease prevalence at four integrated healthcare delivery systems. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:970-976.

Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin ChestMed* 2015; 36: 13–34.

Radhakrishnan DK, Yau Y, Corey M, Richardson S, Chedore P, Jamieson F, Dell SD. Non-tuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis: isolation, prevalence, and predictors. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44:1100–1106.

Ramis IB, Cnockaert M, von Groll A, Nogueira CL, Leão SC, Andre E, Simon A, Palomino JC, Silva PEAD, Vandamme P, Martin A. Antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria using the rapid colorimetric method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34:1403–1413.

Renna M, Schaffner C, Brown K, Shang S, Tamayo MH, Hegyi K et al. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection. *J Clin Invest* 2011; 121: 3554–63.

Renvoise A, Brossier F, Galati E, Veziris N, Sougakoff W, Aubry A et al. Assessing primary and secondary resistance to clarithromycin and amikacin in infections due to *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 7153–5.

Riello, F. N. Identificação molecular de espécies de micobactérias por PCR-RFLP *hsp65* e implicações clínicas do diagnóstico convencional. [Dissertação]. Uberlândia: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia; 2015.

Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M et al. Non-mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* 2009; 4: e5660.

Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 282: 147–159.

Rocchetti TT, Silbert S, Gostnell A, Kubasek C, Campos Pignatari AC, Widen R. Detection of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* Group, and *Mycobacterium fortuitum* Complex by a Multiplex Real-Time PCR Directly from

Clinical Samples Using the BD MAX System. *Journal of Molecular Diagnostics* 2017; 19(2):295-302.

Rosemberg J, Tarantino AB. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. Doenças pulmonares. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 294-380.

Roux AL, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, Bellis G, Vibet M, Roux EL, Lemonnier L, Gutierrez C, Vincent V, Fauroux B, Rottman M, Guillemot D, Gaillard J, Herrmann. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fi brosis in France. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 4124–28.

Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* 1959, 43:273-290.

Saiman L, Siegel J. Infection Control in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 57–71.

Sander P, Prammananan T, Meier A, Frischkorn K, Bottger EC. The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. *Mol Microbiol* 1997; 26: 469–80.

Sanguinetti M, Ardito F, Fiscarelli E, La Sorda M, D'Argenio P, Ricciotti G, Fadda G. Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 816–819.

Sapriel G, Konjek J, Orgeur M, Bouri L, Frézal L, Roux A et al. Genome-wide mosaicism within *Mycobacterium abscessus*: evolutionary and epidemiological implications. *BMC Genomics* 2016; 17:118.

Sarkola A, Makinen J, Marjamaki M, Martilla HJ, Viljanen MK, Soini H. Prospective evaluation of the GenoType assay for routine identification of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect. Dis* 2004; 23:642-645.

Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics* 2014; 15: 359-2164-15-359.

Scarparo C, P. Piccoli A, Rigon G, Ruggiero D, Nista, Piersimoni C. Direct identification of mycobacteria from MB/BacT Alert 3D bottles: comparative

evaluation of two commercial probe assays. J Clin Microbiol 2001; 39:3222-3227.

Scott-Lang VE, Sergeant A, Sinclair CG, Laurenson IF, Biswas A, Tidman MJ et al. Cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection in Edinburgh and the Lothians, South-East Scotland, U.K. Br J Dermatol 2014; 171: 79–89.

Sebastian G, Nagaraja SB, Vijayalakshmi T, Hemalatha K, Vijayalakshmi N, Kumar P. Identification of Non-Tuberculous Mycobacterium by LPA (CM/AS) assay, HPLC and biochemical test: which is feasible for RNTCP? Indian Journal of Tuberculosis 2018; 65:329-334.

Sermet-Gaudelus I, Bourgeois ML, Pierre-Audigier C, Offredo C, Guillemot D, Halley S et al. *Mycobacterium abscessus* and children with cystic fibrosis. Emerg Infect Dis 2003; 9:1587–1591.

Set R, Shastri J. Laboratory aspects of clinically significant rapidly growing mycobacteria. Indian J Med Microbiol 2011; 29:343-352.

Sevilla IA, Molina E, Elguezabal N, Pérez V, Garrido JM, Juste RA. Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay. J Clin Microbiol 2015; 53:930-940.

Shallom SJ, Gardina PJ, Myers TG, Sebastian Y, Conville P, Calhoun LB, et al. New rapid scheme for distinguishing the subspecies of the *Mycobacterium abscessus* group and identifying *Mycobacterium massiliense* isolates with inducible clarithromycin resistance. J Clin Microbiol 2015; 51: 2943–2949.

Sharma K, Sharma A, Modi M, Singh G, Kaur H, Varma S, Sharma M. PCR detection of co-infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* in AIDS patients with meningitis. J Med Microbiol 2012; 61:1789-1791.

Simmon KE, Pounder JI, Greene JN, Walsh F, Anderson CM, Cohen S, Petti CA. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in the United States. J Clin Microbiol 2007; 45: 1978–1980.

Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (2): 296-303.

Stoffels K, Traore H, Vanderbist F, Fauville-Dufaux M. The effect of combined tobramycin-clarithromycin on *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:1041–1044.

Stout JE, Floto RA. 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.

Tan JL, Ngeow YF, Choo SW. Support from Phylogenomic Networks and Subspecies Signatures for Separation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3042–3046.

Tan JL, Ng KP, Ong CS, Ngeow YF. Genomic comparisons reveal microevolutionary differences in *Mycobacterium abscessus* subspecies. *Front Microbiol* 2017; 8: 2042.

Tebas P, Sultan F, Wallace RJ Jr, Fraser V. Rapid development of resistance to clarithromycin following monotherapy for disseminated *Mycobacterium chelonae* infection in a heart transplant patient. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 443–444.

Teo J, Jureen R, Chiang D, Chan D, Lin R. Comparison of two nucleic acid amplification assays, the Xpert MTB/RIF assay and the amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct assay, for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3659-3662.

Tettelin H, Davidson RM, Agrawal S, Aitken ML, Shallom S, Hasan NA et al. High-level relatedness among *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* strains from widely separated outbreaks. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:364–371.

Thomson RM. NTM working group at Queensland TB Control Centre and Queensland Mycobacterial Reference Laboratory. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1576–1583.

Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:906–910.

Tortoli E, Gabini R, Galanti I, Mariottini A. Lethal *Mycobacterium massiliense* sepsis, Italy. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 984–985.

Tortoli E, Kohl TA, Brown-Elliott BA. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. *Int J Syst Evolut Microbiol* 2016; 66: 4471–4479.

Tortoli E, Kohl TA, Brown-Elliott BA, Trovato A, Leão SC, Garcia MJ et al. *Mycobacterium abscessus*, a taxonomic puzzle. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; 68(1):467-469.

Tran AC, Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. Detection of *Mycobacterium avium* complex DNA directly in clinical respiratory specimens: opportunities for improved turn-around time and cost savings. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79:43-48.

Trupiano JK, Sebek BA, Goldfarb J, Levy LR, Hall GS, Procop GW. Mastitis due to *Mycobacterium abscessus* after body piercing. *Clin Infect Dis* 2001; 33:131–134.

van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, Mouton JW. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat* 2012; 15:149–61.

van Ingen J, Zwaan R, Dekhuijzen RP, Boeree MJ, van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae-abscessus* group isolation in 95 patients. *J Infect* 2009; 59:324–331.

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

Viana-Niero C, Lima KV, Lopes ML, Rabello MCDS, Marsola LR, Brilhante VCR, Durham AM, Leão SC. 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: 850–855.

Villar GB, Freitas FTDM, Ramos JP, Campos CED, Caldas PCDS, Bordalo FS, Ramos TCA, Pereira VDN, Santos MC, Santos JHA, Motta GC, Gomes SM, Souza VMMD, Araújo WND. Risk factors for *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* infection after laparoscopic surgery during an outbreak in Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol 2015; 36: 81– 86.

Wallace RJ Jr, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschen JA, Stone MS. Spectrum of Disease Due to Rapidly Growing Mycobacteria. Reviews of Infectious Diseases 1983; 5(4): 657–679.

Wallace RJ Jr, Musser JM, Hull SI, Silcox VA, Steele LC, Forrester GD, Labidi A, Selander RK. Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. J Infect Dis 1989;159:708–716.

Wallace RJ Jr. The clinical presentation, diagnosis, and therapy of cutaneous and pulmonary infections due to the rapidly growing mycobacteria, *M. fortuitum* and *M. chelonae*. Clin Chest Med 1989; 10: 419–29.

Wallace RJ Jr, Brown BA, Silcox VA, Tsukamura M, Nash DR, Steele LC, Steingrube VA, Smith J, Sumter G, Zhang Y, Blacklock Z. Clinical disease, drug susceptibility, and biochemical patterns of the unnamed third biovariant complex of *Mycobacterium fortuitum*. J Infect Dis 1991; 163:598–603.

Wallace RJ Jr, Brown BA, Onyi GO. Skin, soft-tissue, and bone infections due to *Mycobacterium chelonae chelonae*: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. J Infect Dis 1992; 166:405–412.

Wallace RJ Jr, Zhang Y, Brown BA, Fraser V, Mazurck G, Maloney S. DNA large restriction fragment patterns of sporadic and epidemic nosocomial strains

of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. J Clin Microbiol 1993; 3:2697–2701.

Wallace RJ Jr, Silcox VA, Tsukamura M, Brown BA, Kilburn JO, Butler WR, Onyi GO. Clinical significance, biochemical features, and susceptibility patterns of sporadic isolates of *Mycobacterium chelonae*-like organism. J Clin Microbiol 1993; 31:3231–3239.

Wallace RJ Jr, Meier A, Brown BA, Zhang Y, Sander P, Onyi GO et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1676–1681.

Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. Annu Rev Microbiol 1998; 52: 453–490.

Wallace RJ Jr. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. Int J Syst Bacteriol 2001; 51:1751–1764.

Wallace RJ Jr, Zhang Y, Wilson RW, Mann L, Rossmore H. Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. Appl Environ Microbiol 2002; 68:5580–5584.

Wallace RJ Jr, Brown-Elliott BA, McNulty S, Philley JV, Killingley J, Griffith DE et al. Macrolide/azalide therapy for nodular/bronchiectatic *Mycobacterium avium* complex lung disease. Chest 2014; 146: 276–282.

Waters V, Ratjen F. Antibiotic treatment for nontuberculous mycobacteria lung infection in people with cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev 2014;7: CD010004.

Wayne LG, Runyon EH, Kubica GR. Mycobacteria: A guide to nomenclatural usage. Am Rev Resp Dis Baltimore 1969; 119: 107-159.

Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria, Expert Review of Respiratory Medicine 2012; 6 (6):597-613.

Whipps CM, Butler WR, Pourahmad F, Watral VG, Kent ML. Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov., nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 2525-2531.

Widen R, Healer V, Silbert S: Laboratory evaluation of the BD MAX MRSA assay. J Clin Microbiol 2014; 52: 2686-2688.

Wilson RW, Steingrube VA, Bottger EC, Springer B, Brown-Elliot BA, Vincent V, Jost KC, Zhang Y, Garcia MJ, Chiu SH et al. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: An international cooperative study on mycobacterial taxonomy. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 1751–1764.

Winthrop KL, Iseman M. Bedfellows: mycobacteria and rheumatoid arthritis in the era of biologic therapy. Nat Rev Rheumatol 2013; 9: 524–531.

Winthrop KL, Abrams M, Yarkus M, Schwartz I, Ely J, Gillies D, Vugia DJ. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. N Engl J Med 2002; 346:1366–1371.

Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis 1979; 119:107–159.

Wolinsky E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. Clin Infect Dis 1992; 15:1–12.

Wongkitisophon P, Rattanakaemakorn P, Tanrattanakorn S, Vachiramon V. Cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection associated with mesotherapy injection. Case Rep Dermatol 2011; 3: 37-41.

Woods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. Clin Infect Dis 2000; 31:1209–1215.

Woods, G. L., et al. Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. J Clin Microbiol 1999; 37:1676–1682.

Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, Fahie GA, Wanger A, Boulet B et al. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. J Clin Microbiol 2000; 38:656–661.

World Health Organization. Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis: Report on Conclusions and Recommendations. Geneva: WHO; 2009.

Yakrus MA, Hernandez MS, Floyd MM, Sikes D, Butler WR, Metchock B. Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae* isolates. J Clin Microbiol 2001; 39:4103–4110.

Yeh JJ, Wang YC, Sung FC, Kao C. Rheumatoid arthritis increases the risk of nontuberculosis mycobacterial disease and active pulmonary tuberculosis. PLoS One 2014; 9: e110922.

Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F et al. Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. J Clin Microbiol 2009; 47:1985–1995.

Zhu YC, Mitchell KK, Nazarian EJ, Escuyer VE, Musser KA. Rapid prediction of inducible clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus*. Mol. Cel. Probes 29: 514-516. 2015.

