

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Atividade antimicrobiana de diferentes fármacos contra *Mycobacterium abscessus* organizada em biofilmes ou localizada em fagossomos

Artemir Coelho de Brito

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Atividade antimicrobiana de diferentes fármacos contra *Mycobacterium abscessus* organizada em biofilmes ou localizada em fagossomos

Artemir Coelho de Brito

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Brito, Artemir Coelho de
B862a Atividade antimicrobiana de diferentes fármacos contra
Mycobacterium abscessus organizada em biofilmes ou localizada
em fagossomos / Artemir Coelho de Brito. -- São Paulo, 2013.
107p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Mamizuka, Elsa Masae

Co-orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Droga : Resistência em micobactéria : Microbiologia médica
2. Microscopia eletrônica I. T. II. Mamizuka, Elsa Masae, orientador.
III. Sampaio, Jorge Luiz Mello, co-orientador.

616.0142 CDD

Artemir Coelho de Brito

Atividade antimicrobiana de diferentes fármacos contra *Mycobacterium abscessus* organizada em biofilmes ou localizada em fagossomos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
Orientadora/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, _____ de _____.

*“Eu sou de uma terra que o povo padece
Mas não esmorece e procura vencer.
Da terra querida, que a linda cabocla
De riso na boca zomba no sofrer
Não nego meu sangue, não nego meu nome
Olho para a fome, pergunto o que há?
Eu sou brasileiro, filho do Nordeste,
Sou cabra da Peste, sou de Culuminquará.”*

Patativa do Assaré (Adaptado)

À Maria dos Remédios Rosa e
Antônio Coelho de Brito Neto.
Razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha luz e suporte.

Ao Professor Doutor Jorge Sampaio, pela confiança em me orientar neste trabalho tão importante e pelo privilégio de aprender sobre micobactérias, pela oportunidade de compartilhar da forma brilhante como ele conduz a formação acadêmica de cada orientando, exemplo de profissional e cidadão.

À Professora Doutora Elsa Masae Mamizuka, por me receber em seu laboratório e exemplo de humildade mesmo sendo uma das estrelas da microbiologia.

À Suely Sampaio pelo auxílio na realização da microscopia eletrônica. Aos professores Mário Hirata e Rosário Hirata que me receberam em seu laboratório para o estágio probatório.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Clínica pela amizade e apoio na realização dos experimentos.

Às secretárias Ana Dantas, Edna, Suely e Dora e a todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que sempre me atenderam tão bem.

À Universidade de São Paulo e todos os funcionários, principalmente os das bibliotecas, do CEPE e do “bandejão”.

À COSEAS, em nome da assistente social Rosângela, pela vaga de moradia no CRUSP.

À Emanuela Avelar e Marcelo Chuei, meus dois anjos da guarda.

À minha família e em especial, ao meu irmão Edilson.

À todos os professores e amigos que contribuíram na minha formação.

Às minhas amigas, pesquisadoras do Instituto Adolfo Lutz: Conceição Martins, Carmen Giampaglia, Maria Alice Telles, Rosângela Oliveira, Suely Ueki, Érica Chimara, Lucilaine Ferrazoli e Fernanda Simeão, onde tudo começou com micobactérias e por quem eu tenho enorme carinho.

RESUMO

BRITO, A. C. **Atividade antimicrobiana de diferentes fármacos contra *Mycobacterium abscessus* organizada em biofilmes ou localizada em fagossomos.** 2013. 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade De São Paulo, São Paulo, 2013.

A *Mycobacterium abscessus* subspécie *abscessus* é um pesadelo quando envolvida em infecção pulmonar que são incuráveis, a despeito do uso de antimicrobianos com atividade *in vitro*, caso o tratamento não inclua a ressecção cirúrgica da área afetada. É a micobactéria patogênica de crescimento rápido mais frequentemente isolada de culturas de sítios pulmonares. Há um número reduzido de opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções, e é ainda mais reduzido o número de antimicrobianos que atingem concentrações terapêuticas no compartimento intracelular, em particular no fagossomo. O número limitado de antimicrobianos disponíveis para tratamento apontam a necessidade de determinação do perfil de susceptibilidade frente a antimicrobianos isolados e em combinação, nos compartimentos intra e extracelular. Os objetivos deste estudo foram avaliar: a sensibilidade de *M. abscessus* estruturadas em biofilmes e presentes no interior dos macrófagos; a ocorrência de sinergismo quando da associação entre fármacos, inibidores de betalactamase e o anti-inflamatório. As combinações entre os antimicrobianos foram apenas indiferente quanto ao FIC e a atividade dos fármacos em biofilme e em macrófagos é bacteriostático.

Palavras-chave: *Mycobacterium abscessus*; Macrófago; Biofilme; Resistência.

ABSTRACT

BRITO, A. C. **Antimicrobial activity of different drugs against *Mycobacterium abscessus* in biofilms organized or located in phagosomes.** 2013. 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade De São Paulo, São Paulo, 2013.

Mycobacterium abscessus subspecies *abscessus* is a nightmare when involved in lung infection that is incurable, despite the use of antibiotics with in vitro activity, if the treatment does not include surgical resection of the affected area. It is a MCR - rapidly growing mycobacteria pathogenic most frequently isolated from cultures of lung sites. There are a small number of therapeutic options for the treatment of such infections is further reduced and the number of drugs that reach therapeutic concentrations in the intracellular compartment, particularly in the phagosome. The limited number of antimicrobials available for treatment indicate the need for determining the susceptibility profile against antimicrobials alone and in combination, in the intra and extracellular compartments. The objectives of this study were sensitivity of MCR structured biofilms and present in macrophages, the occurrence of synergism when the association between drugs, beta-lactamase inhibitors and anti-inflammatory. Combinations of antimicrobials were just indifferent and the activity of drugs on biofilms and macrophages was bacteriostatic.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*; Macrophage; Biofilm; Resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AMI	Amicacina
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Antimicrobiano
CEF	Cefoxitina
CIM	concentração inibitória mínima
CIF	concentração inibitória fracionária
CIP	Ciprofloxacina
CIP	Coleção de Cultura do Instituto Pasteur
CLA	Claritromicina
CLAV	Clavulanato
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
DOX	Doxiciclina
DIC	Diclofenaco
EPS	Exopolissacarídeo
<i>hsp65</i>	heat shock protein
IMI	Imipenem
LIN	Linezolid
<i>Log</i>	fase logarítmica do crescimento
MER	Meropenem
MH	Mueller Hinton
MIN	Minociclina
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MOX	Moxifloxacina
mRNA	RNA mensageiro
PBP	proteína ligadora de penicilina
PBS	Salina tamponada com fosfato

PCR	reação em cadeia pela DNA polimerase
PRA	reação em cadeia pela <i>Taq</i> DNA polymerase seguida de clivagem com endonucleases e análise dos fragmentos de restrição
PMA	phorbol miristato acetate
MCR	micobactérias de crescimento rápido
RNA	ácido ribonucléico
RNI	Intermediários Reativos de Nitrogênio
ROI	Intermediários Reativos de Oxigênio
rRNA	RNA ribossômico
SULFA/TRIM	Sulfametoxazol/Trimetoprin
tRNA	RNA transportador
TAZ	Tazobactam
TIG	Tigeciclina
UFC	Unidades formadoras de colônias
Σ	Somatório

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Histórico.....	16
1.2. Parede Celular	17
1.3. Taxonomia	18
1.4. <i>Mycobacterium abscessus</i>	22
1.5. Diagnóstico de Micobacterioses não tuberculosas-MNT.....	23
1.6. Epidemiologia de <i>M. abscessus</i> no Brasil.....	24
1.7. Classes de antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções causadas por MNT.....	25
1.8. Mecanismo de Resistência da <i>M. abscessus</i> aos antimicrobianos	28
1.9. Biofilme	30
1.10. Macrófagos e infecções por MNT	33
1.11. Granulomas induzidos por micobactérias.....	36
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivo geral	39
2.2. Objetivos específicos	39

3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Isolados bacterianos	41
3.2. Cepas de referência utilizadas nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	42
3.3. Agentes antimicrobianos.....	42
3.4. Cultivos de isolados em meio sólido e avaliação da morfologia colonial	43
3.5. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo	44
3.6. Avaliação da atividade sinérgica da associação de antimicrobianos.....	44
3.7. Avaliação da associação de fármacos contra MCR estruturadas em biofilmes	46
3.8. Formação de biofilme por <i>Mycobacterium abscessus</i>	48
3.9. Cultivo de Células THP-1 e ensaios de infecção	50
3.10. Ensaios de Microscopia Eletrônica de Transmissão(TEM)	51
4. RESULTADOS,.....	53
4.1. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	53
4.2. Associação entre antimicrobianos e diclofenaco.....	54
4.3. <i>Checkerboard</i> entre antimicrobianos e sulfatrimetoprim.....	55
4.4. Associação entre betalactâmicos e inibidores de betalactamase.....	55
4.5. Associação de quatro antimicrobianos	58
4.6. CIF de quatro antimicrobianos combinados entre si.....	59

4.7. CIF da combinação de três antimicrobianos combinados entre si	50
5.0. Atividade antimicrobiana contra <i>M. abscessus</i> estruturados em biofilme	61
5.1. Cepa padrão <i>M. abscessus</i> ATCC 19977	61
5.2. Atividade antimicrobiana contra isolados clínicos estruturados em biofilme.....	65
6.0 Atividade antimicrobiana contra <i>M. abscessus</i> internalizados em macrófagos	75
6.1. Cepa padrão <i>M. abscessus</i> ATCC 19977	75
6.2. Visão panorâmica da <i>Mycobacterium abscessus</i> fagocitada pelo macrófago.....	84
6.3. Visão aproximada com o bacilo dentro do macrófago e com a membrana do fagossomo bem definido.....	85
7. DISCUSSÃO	88
8. CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Estima-se que as micobactérias tenham surgido há aproximadamente 150 milhões de anos, e o antecessor das micobactérias do complexo *M. tuberculosis* estava presente no leste da África e provavelmente causando doença em hominídeos há cerca de três milhões de anos. Já foi documentada a presença de DNA de *M. tuberculosis* em múmias de indivíduos que viveram no Egito, Índia e China há 5000, 3300 e 2300 anos atrás, respectivamente (DANIEL, 2006). O gênero *Mycobacterium* é o único da família *Mycobacteriaceae*. A etimologia da palavra *Mycobacterium* indica fungo em forma de bastonete, em função de seus aspectos colonial e à microscopia óptica (BRENNER et al, 2005).

A microscopia evidencia que as micobactérias tem algum grau de pleomorfismo. O formato das células é de bacilos retos ou ligeiramente curvos, medindo de 0,2 a 0,7 μ m de largura e 1 a 10 μ m de comprimento. São aeróbios ou microaerófilos, imóveis e não possuem esporos ou cápsulas (HOLT et al, 1994). Atualmente, são conhecidas 164 espécies e 13 subespécies, que fazem parte do gênero *Mycobacterium* que estão descritas na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados (EUZÉBY, 2013).

1.2. Parede Celular

A parede celular das micobactérias é uma das organelas que mais chama atenção nos estudos com células de micobactérias. Possui arquitetura única, composta de quatro camadas que apresenta organização diferente de outros procariotos (**Figura 1**). Composta de diferentes lipídeos, a camada mais externa inclui os glicolipídios, sulfolipídios, fenolglicolipídios, peptidoglicolipídios e os lipoarabinomanano. A rigidez da parede é mantida pela presença do peptidoglicano que forma a camada mais interna da parede e é composto por ácido N-glicolilmurâmico em vez de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria de outras bactérias. A camada seguinte é o arabinogalactano que se liga ao peptidoglicano por meio de ligações fosfodiéster. Ligados covalentemente ao arabinogalactano estão os ácidos micólicos que representam cerca de 60% da parede celular micobacteriana, os quais se constituem de lipídios formados basicamente de ácidos graxos de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono.

A tamanha complexidade e importância da parede celular micobacteriana é explicada, principalmente, pela riqueza de lipídios complexos, responsáveis pela alta resistência das micobactérias aos agentes físicos e químicos e pela propriedade de álcool-ácido resistência (RASTOGI, 2001). Estes ácidos micólicos formam uma cobertura que permite a micobactéria ser resistente à dessecação, podendo sobreviver por períodos prolongados em condições extremas. Essa proteção é importante na resistência a antibióticos, uma vez que a grande maioria é incapaz de penetrar a parede celular (PRIMM et al, 2004).

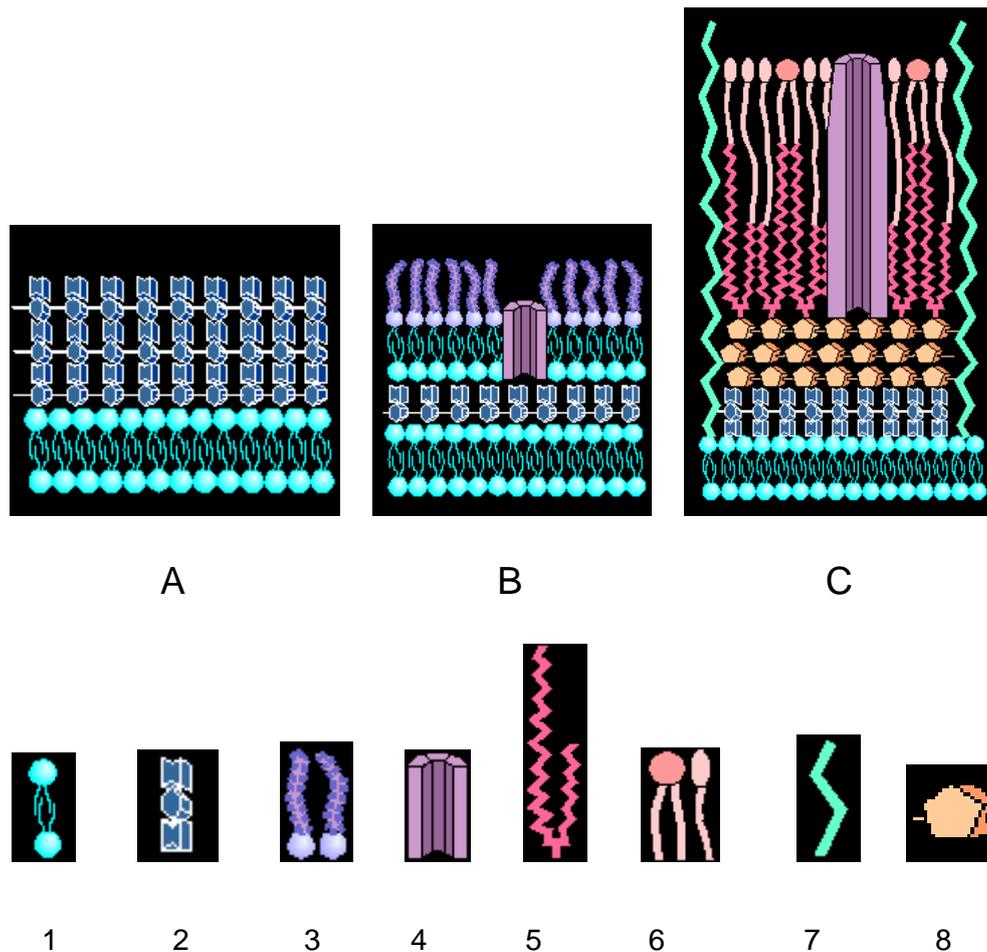


Figura 1 - Representação esquemática da parede bacteriana de organismos Gram-positivos (A), organismos Gram-negativos (B), Micobactérias (C), Fosfolípidios (1), Peptidoglicano (2), Lipídeos + LPS (3), Porina (4), Ác. Micólico (5), Lipídeos (6), Lipoarabinogalactano (7) e Arabinogalactano (8).

Fonte - URL: <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html>

1.3. Taxonomia

A definição do gênero *Mycobacterium* baseia-se em três critérios importantes: porcentagem de citosina e guanina do DNA compreendida entre 31 a 71%, síntese de ácidos micólicos e resistência à descoloração por álcool-ácido (princípio da técnica de Ziehl-Neelsen). As micobactérias são

consideradas Gram-positivas, porém não se coram bem por este método (LEVY-FRÉBAUT & PORTAELS, 1992).

Originalmente as micobactérias foram classificadas de acordo com o seu tempo de crescimento *in vitro* e quanto à produção de pigmentos carotenóides (RUNYON, 1959), em três grupos de crescimento lento nos quais podem ser fotocromógenas (produzem o pigmento somente na presença de luz), escotocromógenas (produzem pigmento também na ausência de luz) e acromógenas (não produzem pigmento) e o grupo de crescimento rápido que podem ser pigmentadas ou não (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Classificação das micobactérias de acordo com o seu tempo de crescimento *in vitro* e produção de pigmentos carotenóides.

Grupo	Crescimento Lento	Crescimento Rápido
Grupo I	Fotocromógenas	-
Grupo II	Escotocromógenas	-
Grupo III	Acromógenas	-
Grupo IV	-	Acromógenas ou não

O tempo de multiplicação é, geralmente lento, com grande variação dentro do gênero, o que permite dividir as espécies quanto ao tempo de crescimento em: rápido – tempo de geração de 3 a 4 horas (crescimento visível em menos de sete dias) e lento – tempo de geração acima de 16 horas (crescimento visível em mais de sete dias). Crescem em meio sólido gerando colônias visíveis a olho nu entre o terceiro e o sétimo dia de incubação, por isso, são classificadas como “Micobactérias de Crescimento Rápido”, pois é

rápido quando comparado com *Mycobacterium tuberculosis*; apresentam tanto colônias lisas como rugosas não pigmentadas (BROWN-ELLIOT, 2002).

A temperatura de crescimento das espécies micobacterianas varia de 25°C a 45°C e as colônias possuem aspecto liso ou rugoso e algumas, na presença ou ausência da luz (WAYNE & KUBICA, 1986).

De acordo com o grau de patogenicidade, as micobactérias são divididas em estritamente patogênicas, patogênicas, potencialmente patogênicas, patógenos raros e saprófitas (TSUKAMURA, 1984). As espécies classificadas como potencialmente patogênicas ou patógenos raros e saprófitas, atualmente designadas micobactérias não tuberculosas (MNTs), incluem diversas espécies que podem causar infecções pulmonares, ganglionares, cutâneas e infecções disseminadas em humanos imunocomprometidos. Entre as micobactérias estritamente patogênicas estão o *Mycobacterium leprae* que causa a hanseníase e o complexo *M. tuberculosis* com as espécies *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. tuberculosis*, que causam a tuberculose humana e/ou animal. As micobactérias *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. peregrinum* estão classificadas como potencialmente patogênicas (DAVID et al, 1989).

Um número crescente de casos e surtos de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido têm sido relatados em publicações nacionais e internacionais. Os agentes mais prevalentes pertencem aos complexos *Mycobacterium chelonae-abscessus* e *Mycobacterium fortuitum-peregrinum* (WALLACE, 1983). Estas espécies são ubíquas no ambiente, podem ser resistentes ao processo de cloração utilizado para tratamento de água de piscinas ou para consumo humano, podem ser resistentes ao

glutaraldeído e a sua replicação ocorre mesmo em condições de escassez de nutrientes. Essas características, quando somadas a procedimentos inadequados de desinfecção e esterilização, e procedimentos invasivos, médicos ou não, criam um cenário favorável à ocorrência de infecções (LE DANTEC et al, 2002).

A nomenclatura bacteriana atual além de *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* constam outras espécies e subespécies. Pelo método de reação da polimerase em cadeia seguido de análise por enzima de restrição (PCR – PRA) do gene *hsp65* são identificados *M. abscessus* tipo 1 e *M. abscessus* tipo 2 (CHIMARA et al, 2008). O *M. abscessus* tipo 2 apresenta por este método os mesmos perfis de fragmentos de DNA que as espécies anteriormente denominadas *M. bolletii* e *M. massiliense*, sua correta diferenciação é feita com o sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB* (ADEKAMBI, 2003; ADEKAMBI e DRANCOURT, 2004; ADEKAMBI, 2004; ADEKAMBI, 2006). Recentemente, baseado em experimentos de hibridização DNA-DNA, foi revisada a nomenclatura dessas espécies, de modo que *M. abscessus* passou a ser designada *M. abscessus* subsp. *abscessus* enquanto *M. massiliense* e *M. bolletii* passaram a ser designadas *M. abscessus* subsp. *bolletii* (SAMPAIO, 2010).

A nomenclatura de MNTs tem sido objeto de constantes atualizações, por vezes causando dificuldades em análises epidemiológicas e diferenciação entre novas infecções e recrudescência do quadro inicial. A espécie *M. abscessus*, patógeno frequentemente encontrado em infecções pulmonares, teve sua nomenclatura modificada várias vezes nos últimos 20 anos. Inicialmente designada como *M. chelonae* (subespécie *abscessus*) passou a *M.*

chelonae (subespécie *abscessus*), até que em 1992 recebeu a designação *M. abscessus*. No entanto, muitos laboratórios ainda relatam seus isolamentos como complexo *M. chelonae* ou *M. chelonae/abscessus* (DALEY e GRIFFITH, 2002).

1.4. *Mycobacterium abscessus*

A *Mycobacterium abscessus* causa infecção pulmonar e os antimicrobianos com atividade *in vitro* não levam à cura microbiológica. A cura clínica só é obtida se a doença for localizada e se for possível a intervenção cirúrgica (Griffith et al, 2007)

A descrição de *M. abscessus* foi realizada há cerca de 60 anos, e a designação da espécie refere-se ao fato de que a cepa tipo (ATCC 19977) foi isolada de um abscesso de joelho.

A *M. abscessus* subsp. *abscessus* é a principal micobactéria de crescimento rápido envolvida com infecções pulmonares e a mais resistente aos antimicrobianos disponíveis. Está entre os principais agentes etiológicos de doença pulmonar causada por MNTs de crescimento rápido, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (PARK et al, 2007; MARTINEZ et al, 2007; STEPHEN et al, 2006).

Apesar de pertencer ao gênero *Mycobacterium*, possuem características muito diferentes daquelas das espécies que são patógenos humanos clássicos *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. bovis*. As MCR são onipresentes na biosfera, sendo encontradas em todos os lugares com

condições favoráveis à vida, pois são capazes de sobreviver em ambientes inóspitos e com pouco nutrientes.

Um histórico confuso sobre a identificação desse microrganismo perpetuou-se ao longo das últimas décadas e permanece até os dias atuais. Costumeiramente os pesquisadores classificavam erroneamente como sendo *M. chelonae*, uma vez que as provas bioquímicas disponíveis produziam resultados muito semelhantes e eram incapazes de fazerem essa diferenciação entre esses dois táxons, que foram então classificados em 1972 como *M. chelonae* subsp. *chelonae* e *M. chelonae* subsp. *abscessus*. Somente 20 anos depois, por meio de estudos de hibridização DNA-DNA foi verificado menos de 70% de similaridade entre essas duas espécies, que foram então renomeadas como as espécies *M. abscessus* e *M. chelonae* (KUSONOKI & EZAKI, 1992).

1.5. Diagnóstico de Micobacterioses não tuberculosas-MNT

Os critérios para o diagnóstico e tratamento de doença causada por micobactérias não tuberculosas foram definidos internacionalmente pela *American Thoracic Society* (Griffith, 2007). Esses critérios têm sido observados no Brasil, conforme citações em estudos realizados em centros de atendimento de pacientes com infecções causadas por micobactérias. No Brasil, não existe uma norma oficial sobre os critérios para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas. No Estado de São Paulo, a Divisão de Tuberculose da Secretaria de Estado da Saúde disponibiliza em sua página eletrônica (www.cve.saude.sp.gov.br), as recomendações para o diagnóstico das micobacterioses, que deve ser fundamentado nos critérios bacteriológicos

e radiológicos específicos para cada agravo (BRASIL, 2005; MATOS et al, 2004; UEKI et al, 2005).

Embora exista variação entre os critérios bacteriológicos para o diagnóstico das infecções causadas pelas MNT é consenso a importância do isolamento repetido do mesmo agente a partir de espécimes biológicos não estéreis, pois nesses casos podem significar colonização transitória do sítio envolvido ou uma contaminação da amostra clínica. O isolamento único, de uma espécie potencialmente patogênica, a partir de espécimes de sítios supostamente estéreis é fortemente sugestivo de infecção (BRASIL, 2005; UEKI et al, 2005).

A identificação específica das espécies de MNTs e a correlação clínico laboratorial é importante para o diagnóstico e a determinação da conduta terapêutica (SENNA et al, 2006).

1.6. Epidemiologia

O aparente aumento das doenças causadas por MNTs pode ser explicado pelo aumento da consciência da existência das mesmas e do aumento de espécimes encaminhados para a cultura e identificação das espécies. O diagnóstico pode ser difícil e demorado, mas a consideração da possibilidade de doença causada por MNTs é o primeiro passo para o diagnóstico correto e instituição do tratamento adequado (MARTINEZ et al, 2007).

Em estudo realizado na Bahia com pacientes em tratamento para tuberculose multirresistente no período de 1998-2003, pesquisadores isolaram micobactérias não tuberculosas em materiais biológicos de 19 (8,2%) dos 231

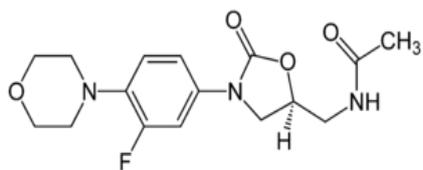
pacientes estudados. Foram identificados os complexos *M. chelonae*-*M. abscessus* (58%), *M. avium-intracelulare* (16%) e *M. fortuitum* (11%) (MATOS et al, 2004).

No Estado de São Paulo, os exames básicos para o diagnóstico da tuberculose foram descentralizados para os laboratórios locais, regionais e de hospitais, ficando os exames mais complexos a cargo do Setor de Micobactérias. Em estudo sobre diversidade das espécies de MNTs no Estado de São Paulo, nos anos de 1991-1997, UEKI et al (2005) observaram que as espécies mais isoladas foram *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (MAC) 64,2% e *M. kansasii* 12,2%. A porcentagem de isolamento das espécies de crescimento rápido foi de 3,9% para *M. fortuitum* e 1,7% para *M. chelonae*. Considerando as duas espécies mais frequentes, o *M. kansasii* foi mais isolado de sitio pulmonar (83%) e o MAC de doença disseminada (44,2%). O isolamento das duas espécies de crescimento rápido foi mais frequente em amostras de origem pulmonar.

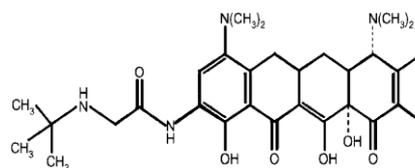
1.7. Classes de antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções causadas por MNT

A amicacina pertence a classe dos aminoglicosídeos, é derivado da kanamicina, tem atividade bactericida. Em contrapartida, o aspecto negativo desse fármaco é o fato de ser oto e nefrotóxico. A claritromicina é um macrolídeo, semi-sintético indicado para tratar infecções bacterianas causadas por bactérias Gram positivas. É um dos antimicrobianos de primeira escolha para tratar infecções pulmonares. A cefoxitina é uma cefamicina, e como

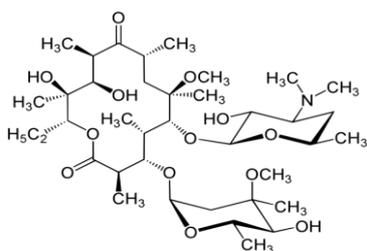
betalactâmico atua sobre a parede celular. O imipenem é um carbapenêmico pertencente à classe dos beta-lactâmicos e seu mecanismo de ação é a inibição da síntese da parede celular. Moxifloxacina é um fármaco do grupo das fluoroquinolonas que tem por mecanismo de ação a inibição da DNA girase, enzima essencial na correção do estresse topológico gerado pela replicação do DNA bacteriano. Trata-se de uma quinolona de geração mais nova do que a ciprofloxacina e levofloxacina, possui em sua molécula a adição de um grupo metóxi na posição R2 do anel comum das quinolonas, que amplia a ação contra bactérias. A linezolida pertence à classe das oxazolidinonas e atua inibindo a síntese proteica e tem potencial contra micobactérias não tuberculosas, incluindo as micobactérias de crescimento rápido (WALLACE, 2001). A tigeciclina é um antibiótico pertencente à família das glicilciclinas, derivado da minociclina e estruturalmente é similar às tetraciclinas, mas com uma substituição na posição D-9 que lhe confere um amplo espectro de atividade. Tem atividade bacteriostática inibindo a síntese proteica ligando-se à subunidade 30S do ribossomo (NOSKIN, 2005) (**Figura 2**).



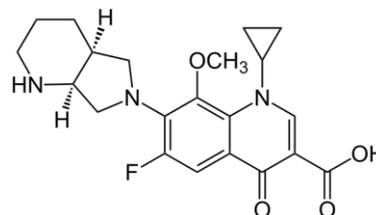
A Linezolid



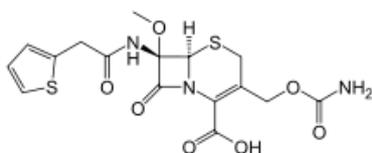
B Tigeciclina



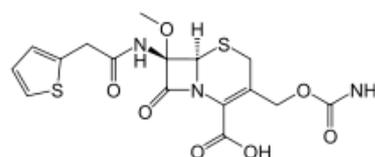
C Claritromicina



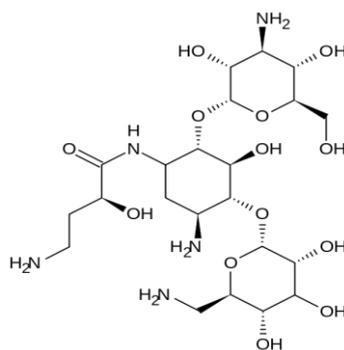
D Moxifloxacina



E Imipenem



F Cefoxitina



G Amicacina

Figura 2 - Estruturas químicas dos principais compostos antimicrobianos com atividade contra micobactérias de crescimento rápido.

1.8. Mecanismo de Resistência da *M. abscessus* aos antimicrobianos

M. abscessus apresenta resistência intrínseca à maioria dos antimicrobianos atualmente disponíveis na prática clínica. Um dos fatores que também contribui para dificultar o tratamento das infecções causadas por essa espécie é o fato de que *M. abscessus* se multiplica dentro de macrófagos, portanto, são resistentes aos antimicrobianos utilizados para tratar a tuberculose (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002). Além disso, este microrganismo é intrinsecamente resistente as fluoroquinolonas, que estão entre os poucos antimicrobianos que possui concentração intracelular satisfatória dentro de fagossomos (TULKENS, 1991).

Não há estudos controlados randomizados quanto ao esquema de tratamento das infecções pulmonares causadas por *M. abscessus*; portanto a escolha é dependente de história clínica do paciente e de acordo com a experiência do médico assistente (JEON et al, 2009).

No esquema inicial são utilizados betalactâmicos como imipenem e cefoxitina, para tratar infecções por *M. abscessus*, mas as concentrações inibitórias mínimas-CIMs *in vitro* são elevadas. A resistência do *M. abscessus* é influenciada por características específicas da célula micobacteriana como: complexidade da parede celular que possui baixa permeabilidade, produção de betalactamases e expressão de PBPs com baixa afinidade aos betalactâmicos (JARLIER, GUTMANN et al, 1991; FATTORINI, OREFICI et al, 1992; MUKHOPADHYAY & CHAKRABARTI, 1997; BROWN-ELLIOTT, NASH et al,

2012). Uma vez que a parede celular é um fator limitante para a ação de antimicrobianos em todas as micobactérias de crescimento rápido, é possível que as PBPs e betalactamases possam ter uma função importante, já que *M. abscessus* apresenta CIMs mais elevadas para imipenem do que *M. fortuitum* (BROWN-ELLIOT & WALLACE, 2002).

O tratamento de infecções causadas por *M. abscessus* fica comprometido quando ocorre a expressão de RNA metilases indutíveis, o que inviabiliza o uso de macrolídeos. Estudos recentes demonstram que quando *M. abscessus* é exposto à eritromicina ou claritromicina *in vitro*, a expressão do mRNA da metilase é aumentada entre 23 a 250 vezes (NASH et al, 2009).

A resistência às oxazolidinonas em MCR é mediada por mutação pontual no rRNA 23S (G2447T genoma de *Escherichia coli*) e acredita-se na existência de um mecanismo, ainda não elucidado, mediado provavelmente por um transportador (SANDER, 2002).

A resistência às fluoroquinolonas pode ser determinada por mutações na subunidade A da girase – gene *gyrA*, devido a presença de uma região responsável por resistência às quinolonas localizada na porção 5' do gene (GUILLERMIN, CAMBAU et al, 1995). Bomba de efluxo, acetilação ou nitrosilação também são mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em MCR (BELLINZONI, BURONI et al, 2009; ADJEI, HEINZE et al, 2007).

A resistência aos aminoglicosídeos é determinada frequentemente por mutações nos genes rRNA 16S e no gene *rpsL* (BROWN-ELLIOTT, NASH et al, 2012). Presença de plasmídeos e expressão de acetilases também são mecanismos envolvidos com resistência aos aminoglicosídeos (MEIER, SANDER et al, 1996).

O diclofenaco apesar de não ser considerado um antimicrobiano e ter seu uso terapêutico limitado ao objetivo de se obter efeito anti-inflamatório, há várias publicações evidenciando a sua ação antimicrobiana contra *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* e *Escherichia coli*. Ensaio de incorporação de timidina tritiada evidenciam que o diclofenaco impede a síntese de DNA. Seu efeito sinérgico foi demonstrado contra *M.tuberculosis*, quando associado à estreptomicina (Mazumdar, 2009). Sua atividade contra MNT foi demonstrada com *M. avium* (Sano, 1999). É plausível supor que o diclofenaco possa ter efeito sinérgico contra *M. abscessus*.

1.9. Biofilme

Em 1933 Henrici A. T definiu que a maioria das bactérias aquáticas não são organismos flutuantes, mas crescem sobre superfícies submersas, por serem bentônicas ao invés de planctônicas, sendo esta a primeira observação citada na literatura sobre a formação de biofilme como característica da vida das bactérias.

Biofilmes são estruturas multicelulares de células microbianas, ligados a superfícies (DAVEY & O' TOOLE, 2000). Essas estruturas são formadas por uma mesma espécie ou espécies distintas, incluindo espécies patogênicas e não patogênicas (**Figura 4**). Essa estrutura, associada às alterações metabólicas fornecem condições para estes organismos se protegerem da ação dos antimicrobianos (DONLAN, 2002). Células que crescem aglomeradas expressam propriedades distintas das células planctônicas, sendo o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, uma das características mais

importantes (O' TOOLE & MAH, 2001). A capacidade de formar biofilme é importante não só para bactérias ambientais, mas para vários patógenos humanos e representa um sério problema de saúde pública devido ao aumento da resistência dos microrganismos associados a ele e a possibilidade desses organismos poderem causar infecções em pacientes com dispositivos médicos.

Antes que as bactérias se fixem à superfície é necessário que se forme o filme condicionante que é a cobertura da superfície por moléculas e nutrientes que sinalizam para a bactéria que o meio é ideal e nesse ambiente favorável inicia-se a estruturação do biofilme através da aderência das bactérias à superfície (DAVEY & O' TOOLE, 2000). Após o biofilme formar-se e atingir a fase de maturação e síntese de exopolissacarídeo (EPS) , ocorre a liberação de microrganismos para o meio planctônico (**Figura 3**), que se dispersam para outros ambientes formando novos biofilmes (O'TOOLE et al, 2000; HALL-STOODLEY et al, 2004). Durante o processo de formação do biofilme, um conjunto de variáveis como composição da superfície, ambiente e expressão de genes essenciais, provocam alterações no metabolismo da bactéria (**Figura 4**), de acordo com a localização dentro da estrutura do biofilme (LAPPIN-SCOTT & COSTERTON, 1989, DUNNE, 2002). Além do crescimento celular, o biofilme aumenta de tamanho devido a produção de componentes extracelulares, derivados do metabolismo das bactérias aderidas e da produção de EPS composto de diversas moléculas orgânicas e inorgânicas (DUNNE, 2002).



Figura 3 - Etapas de formação de biofilmes. Fonte: MATIN et al (2011).

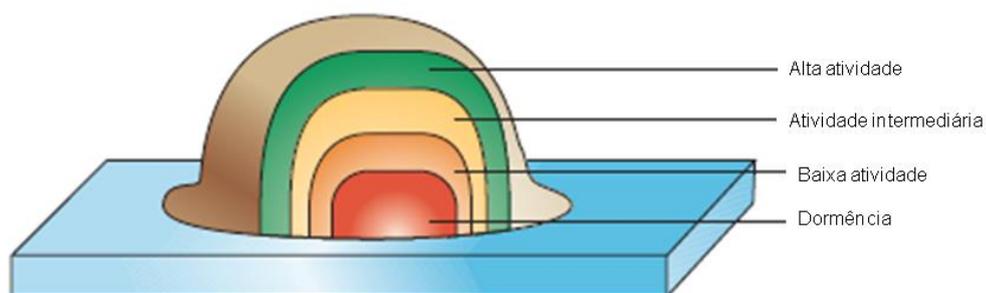


Figura 4 - Camadas de biofilme e atividade metabólica. Fonte: DAVIES (2003).

Estas estruturas são reconhecidas como fator extremamente importante na patogenicidade e têm sido descritas em várias infecções humanas, especialmente aquelas relacionadas a materiais biológicos. Infecções pulmonares causadas por MCR, em pacientes com fibrose cística, também foram relacionadas à estruturação dessas bactérias em biofilmes (DONLAN, 2001).

Em 2008, pesquisadores avaliaram MCR não pigmentadas e potencialmente patogênicas e mostraram que as espécies foram capazes de formar biofilme (MARTIN-DE-HIJAS et al, 2008). Em um estudo epidemiológico sobre as infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido, GADEA e colaboradores (2008) demonstraram que em mais de um terço das infecções

causadas por esses microrganismos é possível detectar sua estruturação em biofilmes.

Posteriormente, MARTIN-DE-HIJAS e colaboradores (2009) pesquisaram o desenvolvimento de biofilme em 168 isolados de micobactérias de crescimento rápido não pigmentadas. Desse total, 123 formaram biofilme. Considerando apenas 41 isolados clinicamente importantes, desenvolviam biofilmes: 87,5% de *M. abscessus*, 73,3% de *M. chelonae* e 61,1% de *M. fortuitum*. A habilidade de formar biofilme não é uniforme entre os isolados de MCR, e está relacionada com a capacidade dos isolados de causar doença humana.

Estudos têm demonstrado que procariontes produzem moléculas de sinalização extracelular que permitem a comunicação célula a célula. Além disso, essa comunicação intercelular está envolvida na regulação de uma variedade de eventos fisiológicos e tem sido chamado *Quorum Sensing*. Em bactérias Gram-positivas, a maioria das moléculas de sinalização são peptídeos ou peptídeos modificados que são biologicamente ativos em concentrações da ordem de nanomoles. O fenômeno do *Quorum Sensing* tem sido pouco estudado em *Mycobacterium* spp. (BELISLE et al, 1999).

1.10. Macrófagos e infecções por MNT

Os macrófagos desempenham um papel fundamental no controle de infecções. Nos pulmões, os macrófagos alveolares são as primeiras células a encontrar bactérias inaladas e todos os tecidos contêm um grande número de macrófagos residentes. Eles derivam dos monócitos pelo sangue que saem da

corrente sanguínea e atingem a maturação em diferentes órgãos sob a influência de fatores teciduais (LOHMANN-MATTHES et al, 1994).

Todas as micobactérias patogênicas e não patogênicas são internalizadas em fagossoma dentro de macrófagos. As micobactérias não patogênicas geralmente são mortas pelos macrófagos, enquanto as patogênicas sobrevivem e crescem (JORDÃO et al, 2008).

Espécies patogênicas, como o *M. tuberculosis* são capazes de impedir a fusão do lisossomo com o fagossoma. Assim, o fagossoma não é acidificado e permanece com baixos níveis de enzimas lisossomais (**Figura 5**) (VERGNE et al, 2004). Além disso, vesículas com ferro carregado de transferrina complexada com receptor de transferrina, são recrutadas para o fagossomo, permitindo o acesso ao ferro pelas micobactérias.

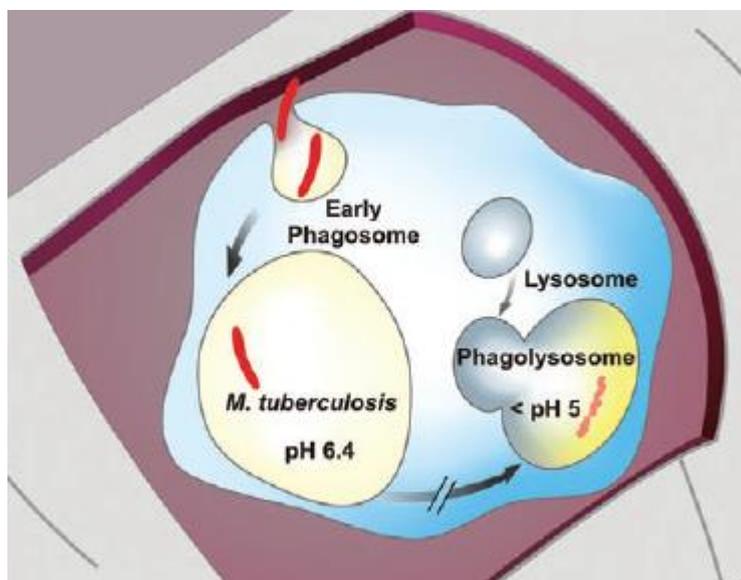


Figura 5 - Esquema representativo da fagocitose de uma micobactéria pelo macrófago alveolar. (Kauffman., 2012)

A capacidade para inibir a maturação do fagossoma tem sido descrita tanto para o *M. avium* e o *M. tuberculosis* (CLEMENS et al, 1996; STURGILL-KOSZYCKI, 1996). O fagossomo é um ambiente de proteção, onde as micobactérias se desviam da ação do sistema imune, mas os mecanismos responsáveis por estes processos ainda são pouco compreendidos (JORDÃO et al, 2008).

O conhecimento sobre a infecção por micobactérias requer a exploração das vias de sinalização da célula hospedeira para entender a sobrevivência intracelular e persistência do agente patogênico. O rompimento destas vias prejudica a maturação de fagossomos em fagolisossomos, modula vias apoptóticas de células-hospedeiros e suprime a resposta imune do hospedeiro. As micobactérias empregam estratégias para desorganizar a sinalização da célula hospedeira através de moléculas importantes nesse processo. Após serem fagocitadas as micobactérias são internalizadas em um vacúolo chamado fagossoma. No processo normal de maturação, o fagossoma contendo o patógeno, se funde com vesículas endocíticas que desencadeia na fusão fagossoma-lisossoma. A membrana do fagossoma é remodelada pelos eventos de fusão, que recrutam ATPase transportadores de próton (vH+-ATPase) que tem como função baixarem o pH interno, permitindo assim, que as hidrolases ácidas derivadas do lisossoma executem sua atividade bactericida. O ambiente do fagolisossoma contendo: pH ácido, enzimas lisossomais, intermediários reativos de nitrogênio - RNI e oxigênio – ROI, e peptídeos tóxicos, é limitante para a sobrevivência da maioria dos bacilos, resultando em morte. Todavia, as micobactérias patogênicas conseguem se

livrar da destruição pelas enzimas lisossomais e interrompem a maturação normal do fagossoma em fagolisossoma (**Figura 6**).

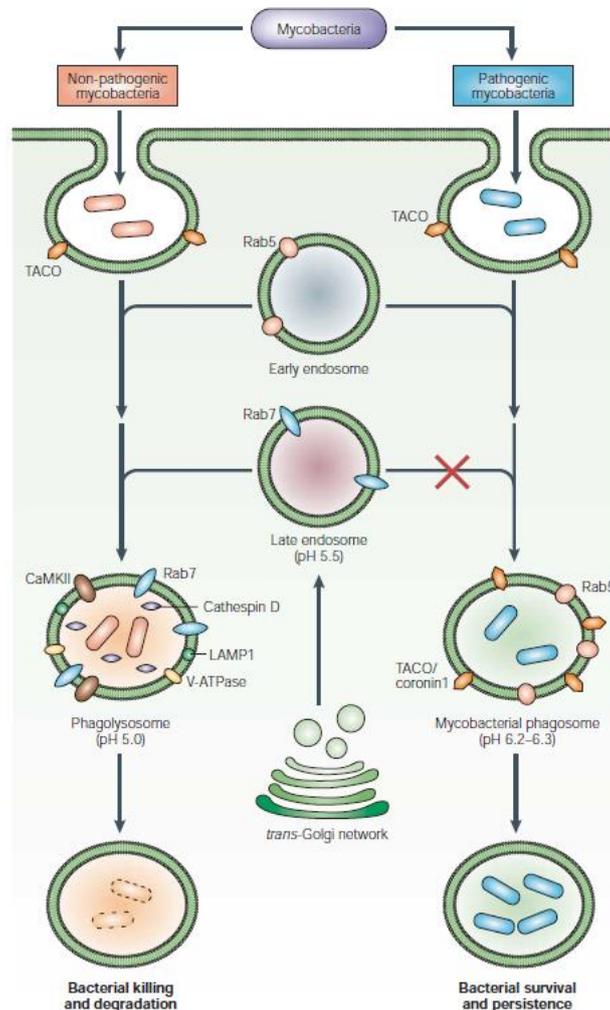


Figura 6 - Esquema ilustrativo sobre a sobrevivência e morte de micobactérias intracelular. Fonte: (KOUL., et al 2004)

1.11. Granulomas induzidos por micobactérias

Quando uma micobactéria é fagocitada pelos macrófagos, estes produzem citocinas inflamatórias e quimiocinas, que tem a função de sinalizar para atrair células do sistema imune para o local da infecção. No entanto, assim como os macrófagos infectados, as demais células não são capazes de

matar a bactéria. Ocorre uma concentração de macrófagos e linfócitos nos tecidos, rodeadas por linfócitos pequenos e algumas células de plasma. Os macrófagos se fundem produzindo células gigantes multinucleadas. Outros macrófagos se transformam em células epitelióides, assim chamados porque morfológicamente se assemelham a células epiteliais, a densidade da matriz extracelular aumenta, principalmente pelo envolvimento de colágeno. Essa reação de fibrose é um meio de encapsular dentro dessa estrutura conhecida como granuloma, as bactérias que não são eliminadas pelo sistema pelos fagócitos (DE BACKER et al, 2007; MANABE et al, 2006; PIETERS, 2008).

Motivação:

O número limitado de antimicrobianos com atividade contra *M. abscessus* e as características particulares da célula micobacteriana somados ao potencial de sobrevivência dentro de fagossomas, e quando estruturada sob a forma de biofilme, torna a *M. abscessus*, um patógeno de difícil erradicação, e atualmente sem alternativas terapêuticas que efetivamente levem à cura da doença pulmonar por esse agente. Diante do exposto, é de fundamental importância que se realizem estudos para investigar a ação de antimicrobianos combinados contra *M. abscessus* localizadas em ambiente intracelular e em biofilmes para ampliar as possibilidades de tratamento.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade de antimicrobianos isoladamente ou associados, contra *Mycobacterium abscessus* estruturadas em biofilme ou localizadas em fagossoma.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a concentração inibitória mínima de antimicrobianos isoladamente;
- Avaliar a concentração inibitória mínima de betalactâmicos em combinação com os inibidores de betalactamase, tazobactam e clavulanato;
- Avaliar a concentração inibitória mínima de antimicrobianos em associação com diclofenaco ou com sulfametoxazol/trimetoprim;
- Avaliar a sensibilidade antimicrobiana de *M. abscessus* estruturadas em biofilmes;
- Avaliar a sensibilidade antimicrobiana de *M. abscessus* fagocitadas;
- Avaliar a ocorrência de sinergismo quando da associação de dois ou três antimicrobianos.
- Avaliar a localização intracelular de *Mycobacterium abscessus* em macrófagos, por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

Foram utilizadas no estudo 20 isolados de *M. abscessus* cultivados de infecções humanas, de origem pulmonar, um por paciente, pertencentes ao Banco de Micobactérias do Instituto Fleury (**Quadro 2**). A identificação preliminar das espécies dos isolados desta coleção foi realizada por PCR do gene *hsp65* seguido de digestão enzimática para análise dos fragmentos do produto amplificado e sequenciamento parcial do gene *rpoB*. Para o estudo foram selecionados isolados sem relação epidemiológica.

Quadro 2. Isolados clínicos para avaliação da CIM isoladamente

Nº do isolado	Data	Sítio
F1326	23/03/2006	ESC
F1350	20/06/2006	ESC
F2098	05/02/2009	LBA
F2176	20/02/2009	ESC
F2394	07/08/2009	ESC
F2503	16/02/2010	LBA
F2484	10/03/2010	ESC
F2523	20/03/2010	ESC
F2493	25/03/2010	ESC
F2534	27/03/2010	ESC
F2504	01/04/2010	ESC
F2535	08/04/2010	LBA
F2542	23/04/2010	ESC
F2558	11/05/2010	LBA
F2651	10/07/2010	ESC
F2649	28/07/2010	LBA
F2650	28/07/2010	LBA
F1041	-	ESC
F1070	-	ESC
F0440	-	ESC

LBA = Lavado brônquico alveolar; ESC = Escarro.

Isolados Clínicos

Os critérios utilizados para seleção dos isolados clínicos foram a diversidade no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos do estudo. Os isolados F2176, F2534 e F2535 foram utilizados nos testes com infecção de células e os isolados F2176 e F2534 foram utilizados nos testes com biofilme. Na infecção de células e nos testes com biofilme foram avaliados isoladamente a atividade dos fármacos: amicacina, claritromicina, cefoxitina, imipenem, moxifloxacina, tigeciclina e linezolida.

3.2. Cepas de referência utilizadas nos testes de Concentração

Inibitória Mínima (CIM):

- *M. abscessus* ATCC 19977
- *M. peregrinum* ATCC 700686
- *M. smegmatis* ATCC 700084
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Escherichia coli* ATCC 35218

3.3. Agentes antimicrobianos

Os antimicrobianos foram adquiridos da United States Pharmacopeia. As soluções foram preparadas considerando-se a potência informada pelo fabricante. Os antimicrobianos utilizados no presente estudo estão dispostos no **Quadro 3**.

Quadro 3 - Antimicrobianos utilizados para avaliação da concentração inibitória mínima de acordo com a sua classe.

Classe	Antimicrobiano
Aminoglicosídeos	Amicacina
Macrolídeos	Claritromicina
Betalactâmicos	Cefoxitina Imipenem
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino Moxifloxacino
Oxazolidinona	Linezolida
Glicilciclina	Tigeciclina
Tetraciclinas	Doxiciclina Minociclina
Anti-inflamatórios	Diclofenaco
Sulfas	Sulfametoxazol/Trimetoprim
Inibidores de betalactamases	Clavulanato Tazobactam

3.4. Cultivos de isolados em meio sólido e avaliação da morfologia colonial

Os isolados foram descongelados e repicados em ágar sangue e incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 3 a 7 dias, em ar ambiente. As culturas foram avaliadas quanto à pureza e fenótipo colonial.

3.5. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo

Foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* no documento M24-A (CLSI, 2003). Foram testados os antimicrobianos amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolida, moxifloxacino, tigeciclina, e sulfametoxazol/trimetoprim utilizando-se as placas RAPMYCO da TREK Diagnostics. Azitromicina, levofloxacino, meropenem, diclofenaco foram testados isoladamente e/ou em combinação utilizando-se placas preparadas no laboratório. As cepas *S. aureus* ATCC 29213 e *M. peregrinum* ATCC 700686 foram utilizadas para controle de qualidade.

3.6. Avaliação da atividade sinérgica da associação de antimicrobianos

A potência das soluções de antimicrobianos foi verificada separadamente utilizando-se as cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 e *M. peregrinum* ATCC 700686. Para avaliação da atividade dos inibidores de betalactamases foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 35218. A atividade das associações foi avaliada utilizando-se o método *checkerboard* (MOODY, 2007). Foram preparadas placas nas quais, uma das drogas teve diluição em cada conjunto de colunas e a segunda droga teve diluição em cada conjunto de linhas, em placas de microtitulação com fundo em U (**Figura 7**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
A 2048	512 1024	512 512	512 256	512 128	512 64	512 32	512 16	512 8	512 4	512 2	512 1	512
B 2048	256 1024	256 512	256 256	256 128	256 64	256 32	256 16	256 8	256 4	256 2	256 1	256
C 2048	128 1024	128 512	128 256	128 128	128 64	128 32	128 16	128 8	128 4	128 2	128 1	128
D 2048	64 1024	64 512	64 256	64 128	64 64	64 32	64 16	64 8	64 4	64 2	64 1	64
E 2048	32 1024	32 512	32 256	32 128	32 64	32 32	32 16	32 8	32 4	32 2	32 1	32
F 2048	16 1024	16 512	16 256	16 128	16 64	16 32	16 16	16 8	16 4	16 2	16 1	16
G 2048	8 1024	8 512	8 256	8 128	8 64	8 32	8 16	8 8	8 4	8 2	8 1	8
H 2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	CC

MAIOR CONCENTRAÇÃO DE DICLOFENACO

256

MAIOR CONCENTRAÇÃO DO ANTIBIÓTICO

512

	RESULTADO APÓS O INÓCULO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	256 512	256 256	256 128	256 64	256 32	256 16	256 8	256 4	256 2	256 1	256 0,5	256
B	128 512	128 256	128 128	128 64	128 32	128 16	128 8	128 4	128 2	128 1	128 0,5	128
C	64 512	64 256	64 128	64 64	64 32	64 16	64 8	64 4	64 2	64 1	64 0,5	64
D	32 512	32 256	32 128	32 64	32 32	32 16	32 8	32 4	32 2	32 1	32 0,5	32
E	16 512	16 256	16 128	16 64	16 32	16 16	16 8	16 4	16 2	16 1	16 0,5	16
F	8 512	8 256	8 128	8 64	8 32	8 16	8 8	8 4	8 2	8 1	8 0,5	8
G	4 512	4 256	4 128	4 64	4 32	4 16	4 8	4 4	4 2	4 1	4 0,5	4
H	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	CC

Figura 7 - Esquema utilizado para montagem do *checkerboard* demonstrando as diversas possibilidades de combinações de antimicrobianos.

As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas antes da realização de leitura visual. O índice FIC (concentração inibitória mínima fracionária) foi calculado para cada conjunto de poços das drogas. O FIC corresponde ao quociente entre a CIM para a droga A em combinação sobre a CIM para a droga A isoladamente. Os somatórios dos valores de FIC foram interpretados como indicativos de sinergismo ($\leq 0,5$), indiferença ($\geq 0,5$ a 4,0) ou antagonismo ($> 4,0$) de acordo com o critério adotado por MOODY, 2007. Os isolados foram testados frente às combinações apresentadas no **Quadro 4**.

Quadro 4 – Esquema utilizado para montagem do *checkerboard* demonstrando as diversas possibilidades de combinações de antimicrobianos.

Fármaco	Combinação
Diclofenaco	Imipenem Cefoxitina Doxiclina Amicacina Claritromicina Moxifloxacino Ciprofloxacino Linezolida Tigeciclina
Sulfametoxazol/Trimetoprim	Amicacina Claritromicina Linezolida Tigeciclina
Clavulanato	Imipenem Meropenem Cefoxitina
Tazobactam	Imipenem Meropenem Cefoxitina
Claritromicina	Amicacina Tigeciclina Linezolida

3.7. Avaliação de fármacos contra MCR estruturadas em biofilmes

Os biofilmes foram produzidos conforme descrito (MOSKOWITZ, 2004). As bactérias foram cultivadas em meio Sauton, (CERI et al, 1999; HOWARD et al, 2006) escolhido após avaliar diversos meios de cultura, por apresentar melhor resultado em termos de rendimento a 30°C, por 72 horas. Após o ajuste da turvação da suspensão bacteriana para 0,5 na escala de

McFarland, 100µL da suspensão foram transferidos cada um dos poços da placa contendo meio estéril. Como suporte para a formação de biofilmes foram utilizadas placas cujas tampas possuem pinos aderidos de modo a mantê-los imersos na suspensão durante a incubação a 30°C por 72 horas sob agitação a 150 rpm (GREENDYKE & BYRD, 2008). Após a incubação, os pinos das tampas foram lavados por três vezes em PBS. A tampa com pinos com biofilme aderidos foi utilizada como inóculo para outra placa contendo antibióticos diluídos em 100µL de caldo MH. Sete antimicrobianos foram testados contra a cepa de *M. abscessus* ATCC 19977 e dois isolados clínicos. Depois da incubação por três dias a 30°C, os pinos foram lavados com tampão PBS estéril por três vezes e os pinos foram imersos em uma placa com 100µL de MH, livre de antibióticos. Para transferir os biofilmes dos pinos para os poços, a placa foi sonicada a 150 Hz por 20 segundos. A tampa com os pinos foi descartada e substituída por uma tampa padrão (**Figura 8**). A densidade óptica a 570 nm (DO_{570}) foi medida após incubação a 30°C por 72 horas. O crescimento adequado de biofilme para os poços controle positivo foram definidos pela diferença da DO medida dos poços cujos pinos tiveram contato com antimicrobianos e os poços controle. Após a incubação, 10µL de cada concentração dos respectivos antimicrobianos foram semeados em MH em placa para avaliação do crescimento de células viáveis. Os antimicrobianos foram testados nas concentrações preconizadas pelo CLSI (CLSI, 2003).

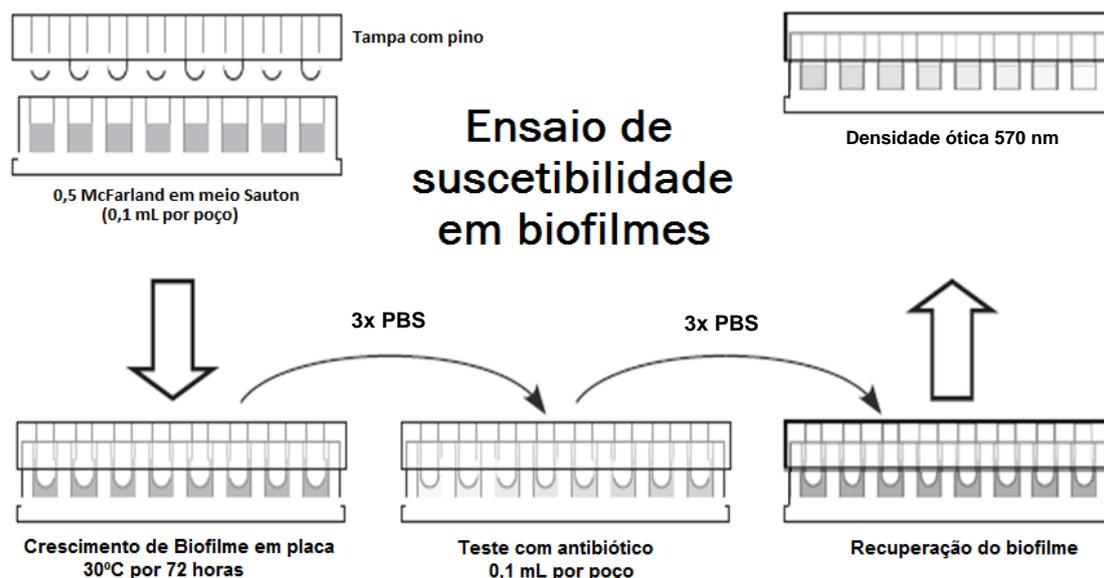


Figura 8 - Representação esquemática da produção de biofilme e teste de suscetibilidade. Fonte: MOSKOWITZ et al (2004).

3.8. Formação de biofilme por *Mycobacterium abscessus*

A padronização foi realizada utilizando a cepa *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977. A cepa foi inoculada em meio Agar 7H11 antes de, incubação a 30°C por 5 a 7 dias. Para o preparo da suspensão bacteriana foi usado o meio de Sauton líquido (CERI et al, 1999; HOWARD et al, 2006), e os meios Mueller Hinton e meio 7H9. Foi realizado o ajuste da turvação da suspensão bacteriana para 0,5 na escala de *McFarland*, e 0,1 mL da suspensão foi distribuída em cada poço, em uma placa de 96 poços. Uma coluna da placa foi semeada apenas meio de cultura estéril como controle negativo (**Figura 9**).

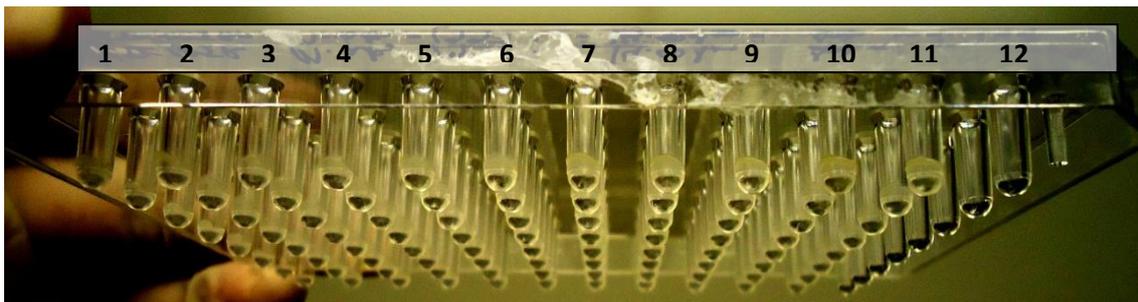


Figura 9 - Formação de biofilme. Poços 1 a 11 - biofilme positivo; 12 - controle negativo.

Como suporte para a formação de biofilmes foram utilizadas placas cujas tampas possuem pinos aderidos, correspondentes a cada poço, que permaneceram imersos na suspensão durante a incubação a 30°C por 72 horas sob agitação a 150 rpm (GREENDYKE & BYRD, 2008). Após a incubação, os pinos das tampas foram lavados por três vezes em PBS estéril e a seguir a tampa com pinos com biofilmes aderidos foi utilizada como inóculo para outra placa contendo apenas meio de cultura Mueller Hinton em caldo. As células bacterianas aderidas aos pinos foram removidos por sonicação (150 Hz), por 20 segundos e o sobrenadante foi semeado em meio MH Agar para avaliar a viabilidade das células bacterianas.

Para confirmar a formação de biofilme nos pinos, foram fixados em metanol por 30 minutos e em seguida corados com cristal violeta por 1h. Os pinos foram descorados com etanol 100% e a densidade óptica a 570 nm (DO_{570}) foi medida em uma placa de 96 poços contendo a solução que resultou da descoloração.

3.9. Cultivo de Células THP-1 e ensaios de infecção

Células THP-1 (gentilmente cedidas pelo Prof. Rui Curi), linhagem tumoral derivada de monócitos humanos, foram mantidas em nitrogênio líquido. Para os ensaios foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina. As células foram estimuladas com 15 ng/mL de acetato de forbol-miristato por 24 horas para indução da diferenciação celular em células semelhantes a macrófagos. Para o ensaio de infecção as células foram incubadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (OBERLEY-DEEGAN, LEE et al, 2009). As infecções foram realizadas com o MOI 3/1 e incubadas por 6 horas em estuf. Os antimicrobianos foram adicionados nas concentrações interpretadas como indicativas de sensibilidade segundo o CLSI (CLSI, 2003). Concentrações mais elevadas do que as indicadas pelo CLSI também foram testadas e para isso foram feitos testes de citotoxicidade, e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer (Figura 10).

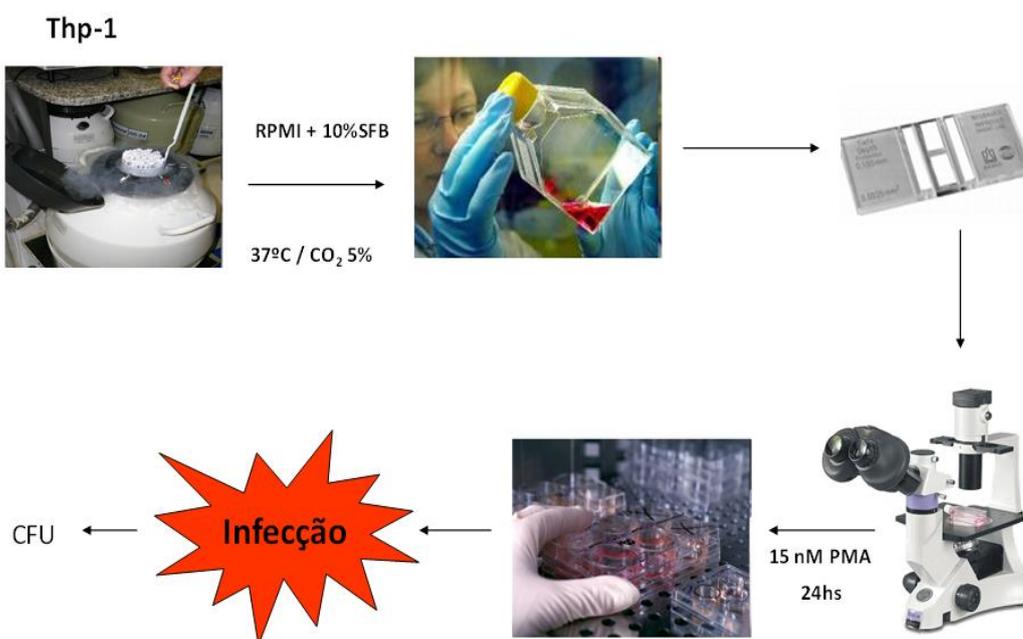


Figura 10 - Representação esquemática do fluxo de trabalho implementado nos ensaios com macrófagos. Fonte – (OBERLEY-DEEGAN, LEE et al, 2009)

3.10. Ensaio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Anterior à infecção, todas as etapas de preparação das células foram iguais a metodologia para testes com drogas, com a modificação de bacilos por células de 3/1 para 10/1. Após infecção por 6 horas, a preparação foi lavada 3 vezes com tampão PBS e adicionado meio RPMI contendo o fármaco amicina na concentração 256µg/ml, para eliminar os bacilos que estivessem apenas aderido à célula e não fagocitado, após 24 horas, as células, aderidas nas lamínulas foram lavadas com tampão PBS 1X por três vezes e fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato (pH 7,2) e deixadas durante 16 horas a 4°C. Após tratamento com 0,1 M de tampão cacodilato, a preparação foi pós-fixada com 1% de tetróxido de ósmio e as células foram desidratadas com gradiente seriado de etanol e tratadas com óxido de propileno. Em seguida, a preparação foi embebida em resina Araldite. Blocos foram polimerizados a 60°C por 48 h. Cortes ultrafinos foram corados com 2% de solução aquosa de acetato de uranila e citrato de chumbo a 2,5%. O material foi examinado por microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906E, Zeiss) operando a 80KV.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os testes de microdiluição em caldo foram realizados em 20 isolados clínicos de *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Destes, apenas a tigeciclina apresentou 100% de sensibilidade. Os antimicrobianos amicacina, claritromicina, cefoxitina, imipinem e linezolida apresentaram taxa de resistência de 5% a 25%. Todos os isolados foram resistentes ao sulfametoxazol, doxiciclina e minociclina foram 100% resistentes. Quanto às fluorquinolonas, as taxas de resistência foram 70% e 85% respectivamente para ciprofloxacina e moxifloxacina (**Figura 12**).

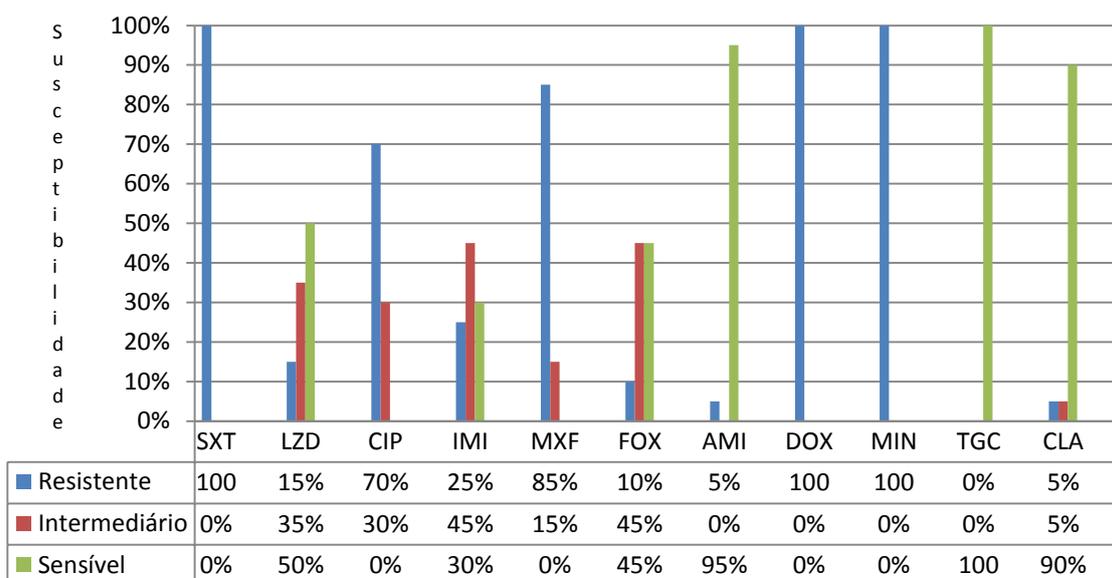


Figura 12 - Representação gráfica dos perfis de susceptibilidade de 20 isolados clínicos de *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* frente a 11

antimicrobianos. STX-Sulfametoxazol, LZD-Linezolida, CIP-Ciprofloxacina, IMI-Imipenem, MXF-Moxifloxacino, FOX-Cefoxitina, AMI-Amicacina, DOX-Doxiciclina, MIN-Minociclina, TGC-Tigeciclina, CLA-Clarithromicina.

4.2. Associação entre antimicrobianos e diclofenaco

Os testes de combinação de drogas com o anti-inflamatório diclofenaco foi realizado com nove antimicrobianos utilizando a cepa padrão *M. abscessus* ATCC 19977. Não houve alteração nas CIMs dos antimicrobianos quando combinados com diclofenaco (**Quadro 5**).

Quadro 5 - Associação de antimicrobianos com diclofenaco.

ATM	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
		sem Diclofenaco	com Diclofenaco
DIC	256 - 4	≥ 256	-
IMI	32 - 0,01	2	2
FOX	512 - 0,5	64	64
DOX	512 - 0,5	≥ 1024	≥ 1024
AMI	32 - 0,5	16	16
CLA	0,5 - 0,005	0,5	0,5
MOX	512 - 0,5	8	8
CIP	512 - 0,5	32	32
LIN	32 - 0,5	16	16
TIG	4 - 0,05	2	2

ATM=antimicrobianos; IMI-Imipenem; FOX-Cefoxitina; DOX-Doxiciclina; AMI-Amicacina; CLA-Clarithromicina; MXF-Moxifloxacino; CIP-Ciprofloxacina; LZD-Linezolida; TIG-Tigeciclina.

4.3. *Checkerboard* entre antimicrobianos e sulfa-trimetoprim

As combinações de sulfa-trimetoprim foram realizadas com quatro dos antimicrobianos mais ativos contra *M. abscessus*. Os resultados das CIMs obtidos não evidenciaram sinergismo ou antagonismo nos testes com a cepa ATCC 19977 (**Quadro 6**).

Quadro 6 - Atividade de quatro drogas combinadas com sulfametoxazol/trimetoprim, por meio da técnica de *checkerboard*

ATM	Concentrações (µg/mL)	CIM (µg/mL)	
		sem SULFA/TRIM	com SULFA/TRIM
SUL/TRIM	152 - 0,1/ 8 - 0,01	-	≥ 152 – 8
CLA	0,5 - 0,005	0,5	0,5
AMI	32 - 0,5	16	16
TIG	4 - 0,05	2	2
LIN	32 - 0,5	16	16

SULFA/TRIM: Sulfametoxazol/Trimetoprim; AMI-Amicacina; CLA-Claritromicina; LZD-Linezolida; TIG-Tigeciclina.

4.4. Associação entre betalactâmicos e inibidores de betalactamase

Três antibióticos betalactâmicos – imipenem, ceftazidima e meropenem - foram avaliados individualmente e de forma combinada com os inibidores de betalactamase clavulanato ou tazobactam. Os resultados obtidos mostraram que não houve diminuição da CIM quando da adição dos inibidores (**Quadro 7**).

Quadro 7 - Atividade de três betalactâmicos com os inibidores de beta-lactamase clavulanato e tazobactam em isolados de *M.abcessus* ATCC 19977.

ATM	Concentração (µg/mL)	CIM (µg/mL)			
		sem CLAV	com CLAV	sem TAZ	com TAZ
IMI	32-0,01	2	2	2	2
MER	256-4	32	32	32	32
CEF	256-4	64	64	64	64

IMI: Imipenem; MER:Meropenem; FOX: Cefoxitina

O **Quadro 8** apresenta os resultados da Concentração Inibitória Fracionária- CIF para nove antimicrobianos avaliados no *checkerboard*.

Quadro 8 – CIF de nove antimicrobianos em combinação com Diclofenaco, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Clavulanato e Tazobactam contra a cepa *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977.

Combinação A + B	CIM A ($\mu\text{g/mL}$)	CIM B ($\mu\text{g/mL}$)	CIF A	CIF B	\sum CIF (CIF A + CIF B)	Interpretação
Diclofenaco + Imipenem	≥ 256	2	1	1	2	I
Diclofenaco + Cefoxitina	≥ 256	64	1	1	2	I
Diclofenaco + Doxiciclina	≥ 256	≥ 1024	1	1	2	I
Diclofenaco + Amicacina	≥ 256	16	1	1	2	I
Diclofenaco + Claritromicina	≥ 256	0,5	1	1	2	I
Diclofenaco + Ciprofloxacina	≥ 256	32	1	1	2	I
Diclofenaco + Tigeciclina	≥ 256	2	1	1	2	I
Sulfametoxazol/Trimetoprim + Amicacina	$\geq 152/8$	16	1	1	2	I
Sulfametoxazol/Trimetoprim + Claritromicina	$\geq 152/8$	0,5	1	1	2	I
Sulfametoxazol/Trimetoprim + Linezolida	$\geq 152/8$	16	1	1	2	I
Sulfametoxazol/Trimetoprim + Tigeciclina	$\geq 152/8$	2	1	1	2	I
Clavulanato + Imipenem	≥ 128	2	1	1	2	I
Clavulanato + Meropenem	≥ 128	32	1	1	2	I
Clavulanato + Cefoxitina	≥ 128	64	1	1	2	I
Tazobactam + Imipenem	≥ 128	2	1	1	2	I
Tazobactam + Meropenem	≥ 128	32	1	1	2	I
Tazobactam + Cefoxitina	≥ 128	64	1	1	2	I

Legenda: CIFA=Ac/As: CIF de A é o quociente entre a CIM do fármaco A combinado e do fármaco isolado. CIFB=Bc/Bs: CIF de B é o quociente entre a CIM do fármaco B combinado e do fármaco isolado. \sum CIF = CIFA +CIFB; I- Indiferente.

4.5. Associação de quatro antimicrobianos

A avaliação da atividade antimicrobiana contra *M. abscessus* ATCC 19977 foi testada combinando-se dois a dois os fármacos: amicacina, tigeciclina, claritromicina e linezolida. Em todas as combinações a CIM do antimicrobiano isoladamente foi a mesma que a observadas para cada o antimicrobiano combinado (**Quadro 9**). Para a combinação linezolida e claritromicina houve redução das CMI's mas o Σ CIF indica indiferença.

Quadro 9- Atividade antimicrobiana de combinações entre dois fármacos.

ATM	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CIM	Combinação		
			TIG	CLA	AMI
LIN	32 - 0,5	32	16 \ 2	16 \ 0,5	16 \ 16
TIG	2,0 - 0,02	2	-	2 \ 0,5	2 \ 16
CLA	0,5 - 0,005	0,5	0,5 \ 2	-	0,5 \ 16
AMI	32 - 0,5	16	16 \ 2	16 \ 0,5	-

Valores à esquerda da barra (\) estão relacionados aos antimicrobianos indicados na linha, e os valores à direita aos antimicrobianos indicados na coluna.

Quadro 10 - Atividade antimicrobiana da associação claritromicina(A) e linezolida(B).

Pontos	CIFA=Ac/As	CIFB=Bc/Bs	Σ CIF	Σ CIF	INTERPRETAÇÃO
1	0,1/0,5=0,2	8/16=0,5	0,5 + 0,2	0,7	I
2	0,2/0,5=0,4	8/16=0,5	0,4 + 0,5	0,9	I
3	0,2/0,5=0,4	4/16=0,25	0,4 + 0,2	0,6	I
4	0,2/0,5=0,4	2/16=0,1	0,1 + 0,2	0,5	I

Legenda: $CIFA=Ac/As$: CIF de A é o quociente entre as CIMs para o fármaco A combinado e isolado. $CIFB=Bc/Bs$: CIF de B é o quociente entre as CIMs do fármaco B combinado e isolado. $\sum CIF = CIFA + CIFB$. 1, 2, 3 e 4: pontos com inibição do crescimento; I: Indiferente.

4.6. CIF de quatro antimicrobianos combinados entre si

O **Quadro 11** mostra a interpretação da CIF para os antimicrobianos amicacina, linezolida, claritromicina e tigeciclina em um único ponto de redução da CIM.

Quadro 11 - Somatório dos índices de Concentração Inibitória Mínima ($\sum CIF$) das combinações de quatro antimicrobianos em um único ponto de redução da CIM.

Pontos		$CIFA=Ac/As$	$CIFB=Bc/Bs$	$\sum CIF$	$\sum CIF$	INTERPRETAÇÃO
A	B					
AMI + LIN		$16/32=0,5$	$16/16=1$	$0,5 + 1$	1,5	I
TIG + LIN		$2/4=0,5$	$16/32=0,5$	$0,5 + 0,5$	1	I
AMI + CLA		$16/16 = 1$	$0,5/0,5 = 1$	$1 + 1$	2	I
AMI + TIG		$16/32 = 0,5$	$1/2 = 0,5$	$0,5 + 0,5$	1	I

Legenda: $CIFA=Ac/As$: CIF de A é o quociente da droga A combinada e sozinha. $CIFB=Bc/Bs$: CIF de B é o quociente da droga B combinada e sozinha. $\sum CIF = CIFA + CIFB$. 1, 2, 3 e 4: pontos com inibição do crescimento. I: Indiferente.

4.7. CIF da combinação de três antimicrobianos combinados entre si

Avaliações contendo três fármacos foram realizadas e o resultado foi calculado excluindo o antimicrobiano em negrito. Quando combinado o terceiro ATM, o ponto de inibição diminuiu. O **Quadro 12** apresenta o somatório CIF de combinações entre três antimicrobianos.

Quadro 12 - Somatório dos índices de Concentração Inibitória Mínima Fracionária (Σ CIF) de combinações entre três antimicrobianos

Combinações de antimicrobianos	CIF A = Ac/As	CIF B = Bc/Bs	Σ CIF = CIF A +CIF B	RESULTADO
Linezolida + Tigeciclina + Claritromicina	8/32=0,25	0,25/1=0,25	0,25 + 0,25 = 0,5	I
Linezolida + Tigeciclina + Claritromicina	8/32=0,25	0,1/0,25=0,4	0,25 + 0,25 = 0,5	I
Linezolida + Tigeciclina + Claritromicina	0,25/1=0,25	0,1/0,25=0,4	0,25 + 0,4 = 0,6	I
Linezolida + Tigeciclina + Amicacina	16/32=0,5	2/4=0,5	0,5 + 0,5 = 1,0	I
Linezolida + Tigeciclina + Amicacina	16/32=0,5	16/32=0,5	0,5 + 0,5 = 1,0	I
Linezolida + Tigeciclina + Amicacina	2/4=0,5	16/32=0,5	0,5 + 0,5 = 1,0	I
Linezolida + Claritromicina + Amicacina	16/32=0,5	0,25/0,5=0,5	0,5 + 0,5 = 1,0	I
Linezolida + Claritromicina + Amicacina	16/32=0,5	8/32=0,2	0,5 + 0,2 = 0,7	I
Linezolida + Claritromicina + Amicacina	0,25/0,5=0,5	8/32=0,2	0,5 + 0,2 = 0,7	I
Claritromicina + Tigeciclina + Amicacina	0,25/0,5=0,5	1/2=0,5	0,5 + 0,5 = 1,0	I
Claritromicina + Tigeciclina + Amicacina	0,25/0,5=0,5	8/16=0,5	0,5 + 0,5 = 1,0	I
Claritromicina + Tigeciclina + Amicacina	1/2=0,5	8/16=0,5	0,5 + 0,5 = 1,0	I

Legenda: CIFA=Ac/As: CIF de A é o quociente da droga A combinada e sozinha. CIFB=Bc/Bs: CIF de B é o quociente da droga B combinada e sozinha. Σ CIF CIFA +CIFB. 1, 2, 3 e 4: pontos com inibição do crescimento. I: Indiferente. Os antimicrobianos em negrito foram excluídos do cálculo do CIF.

5. Atividade antimicrobiana contra *M. abscessus* estruturadas em biofilme

5.1. Cepa padrão *M. abscessus* ATCC 19977

A avaliação do efeito dos antimicrobianos contra *M. abscessus* quando estruturados em biofilme foi realizado com os seguintes antimicrobianos: amicacina, cefoxitina, claritromicina, imipenem, linezolida, moxifloxacina e tigeciclina. Quando comparados com o controle positivo não foi observada diminuição importante nos valores de DO, mesmo em concentrações elevadas. As **Figuras 13 a 19** mostram a taxa de crescimento bacteriano frente aos antimicrobianos avaliados.

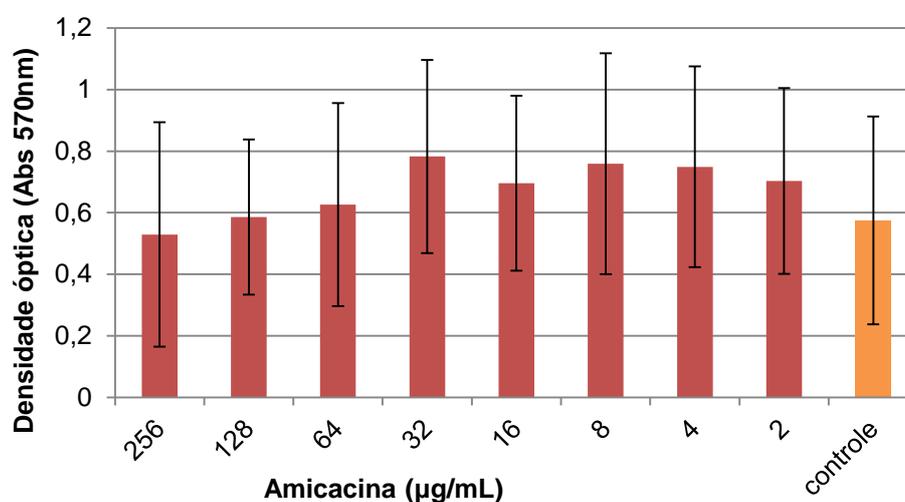


Figura 13 – Atividade inibitória da amicacina sobre *M. abscessus* ATCC 19977 estruturada em biofilme

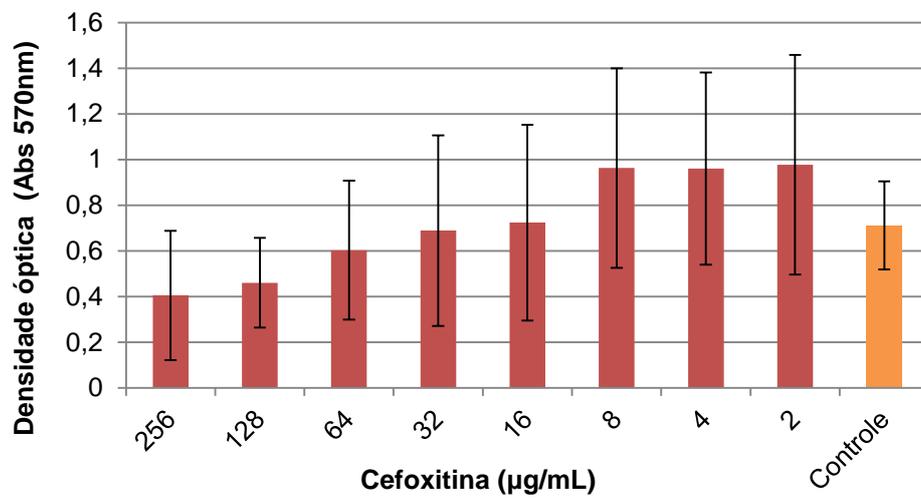


Figura 14 – Atividade inibitória da cefoxitina sobre *M. abscessus* ATCC 19977 estruturada em biofilme

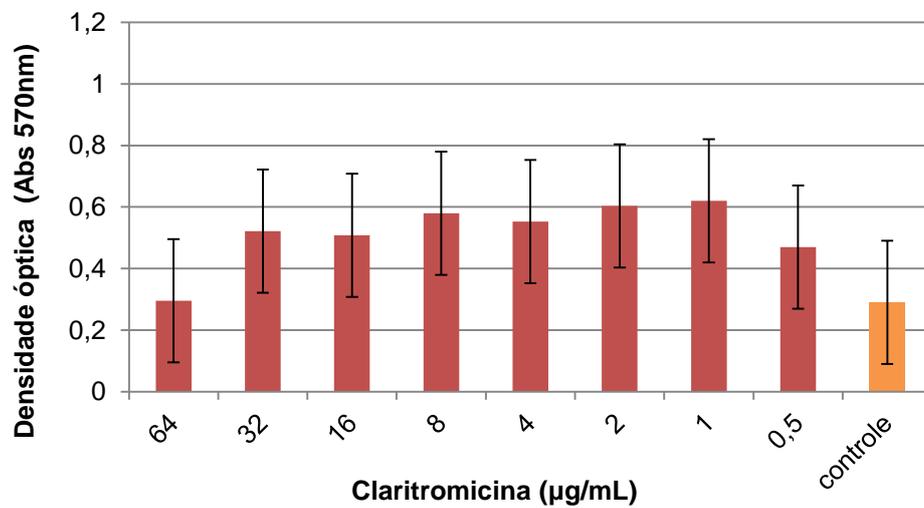


Figura 15 – Atividade inibitória da claritromicina sobre *M. abscessus* ATCC 19977 estruturada em biofilme.

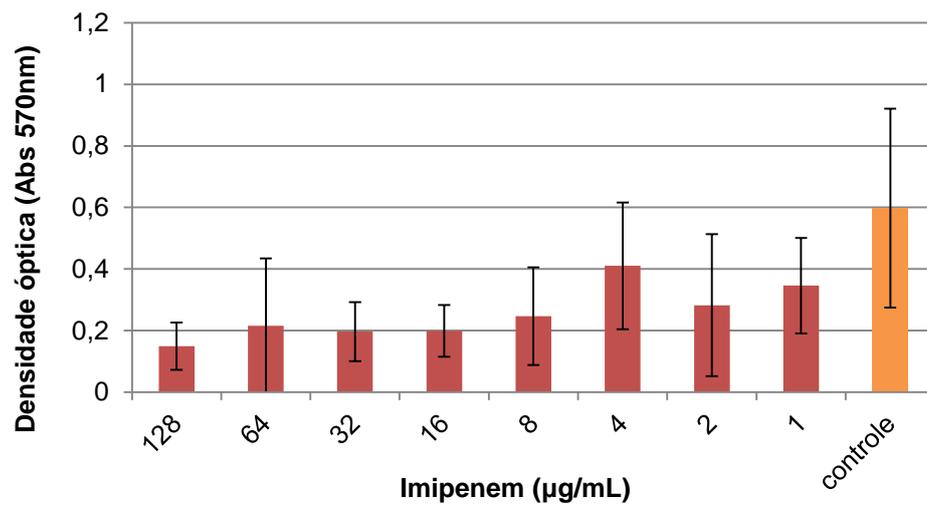


Figura 16 – Atividade inibitória da imipenem sobre *M. abscessus* ATCC 19977 estruturada em biofilme.

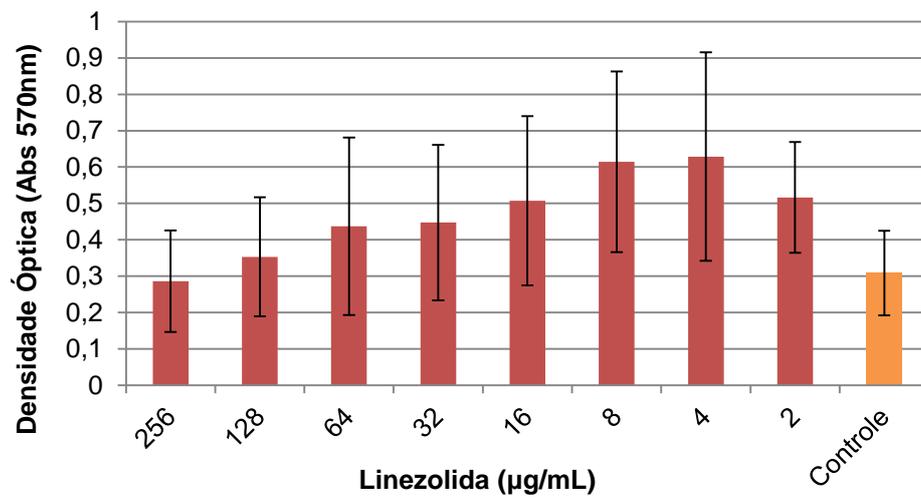


Figura 17 – Atividade inibitória da linezolid sobre *M. abscessus* ATCC 19977 estruturada em biofilme.

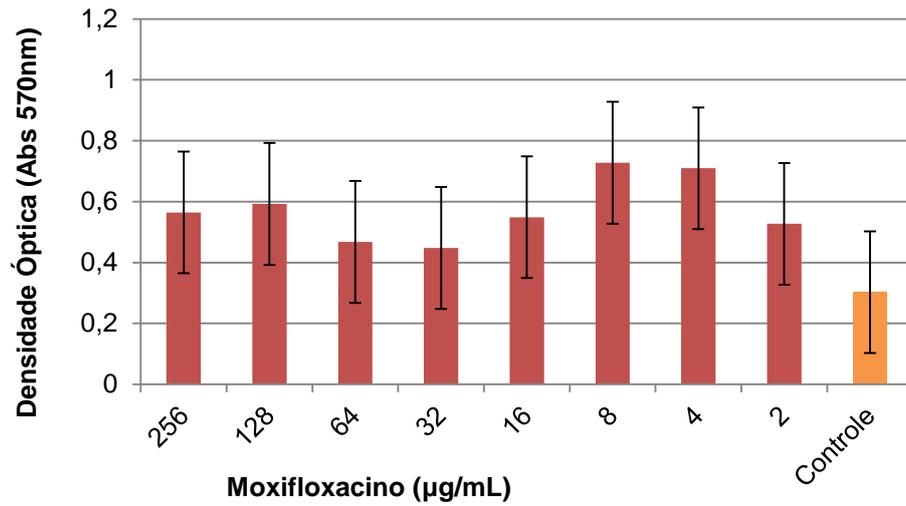


Figura 18 – Atividade inibitória da moxifloxacina sobre *M. abscessus* ATCC 19977 estruturada em biofilme.

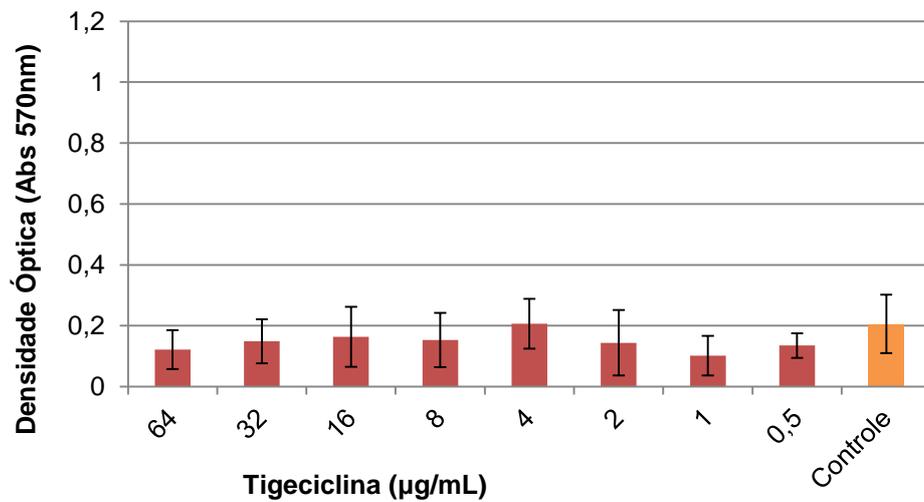


Figura 19 – Atividade inibitória da tigeciclina sobre *M. abscessus* ATCC 19977 estruturada em biofilme.

5.2. Atividade antimicrobiana contra isolados clínicos estruturados em biofilme

Nenhum dos fármacos testados isoladamente foi capaz de inibir a proliferação da cepa *M. abscessus* ATCC 19977 e dois isolados clínicos estruturados em biofilmes. Apesar de haver redução da D.O. média em comparação àquela do controle, há superposição dos desvios padrão.

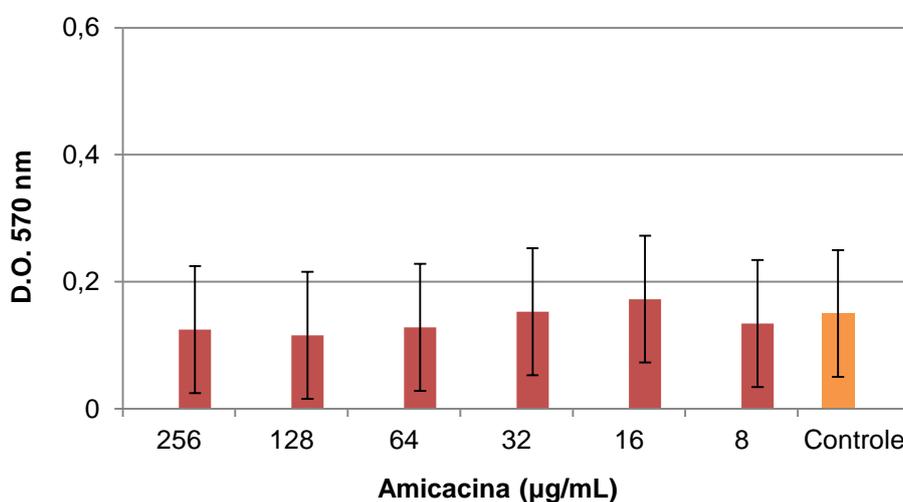


Figura 20 – Atividade inibitória da amicacina sobre *M. abscessus* F2176 estruturada em biofilme.

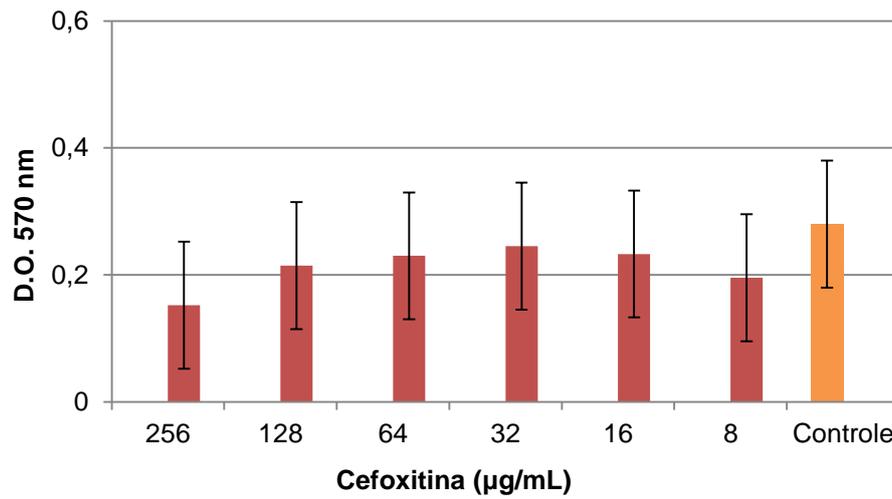


Figura 21 – Atividade inibitória da cefoxitina sobre *M. abscessus* F2176 estruturada em biofilme.

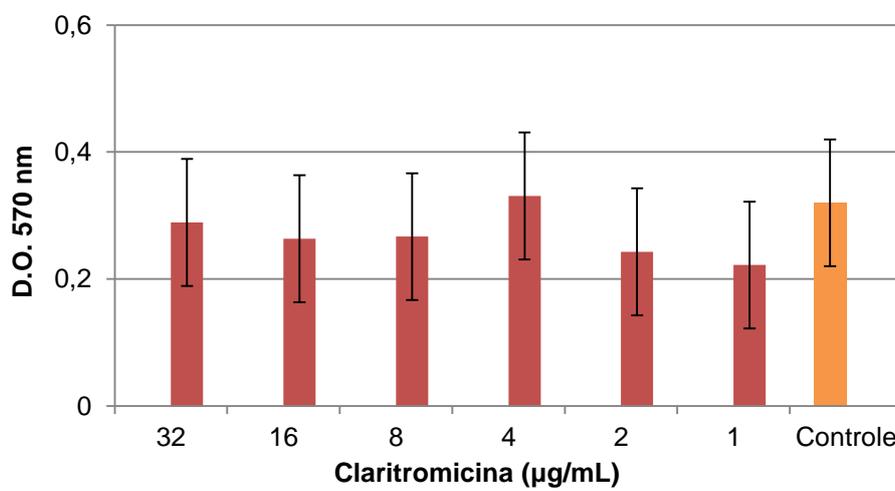


Figura 22 – Atividade inibitória da claritromicina sobre *M. abscessus* F2176 estruturada em biofilme.

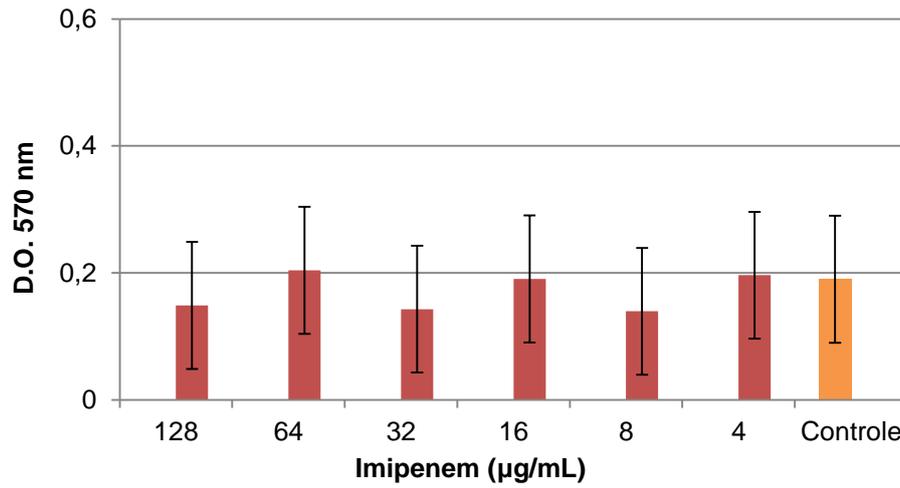


Figura 23 – Atividade inibitória do imipenem sobre *M. abscessus* F2176 estruturada em biofilme.

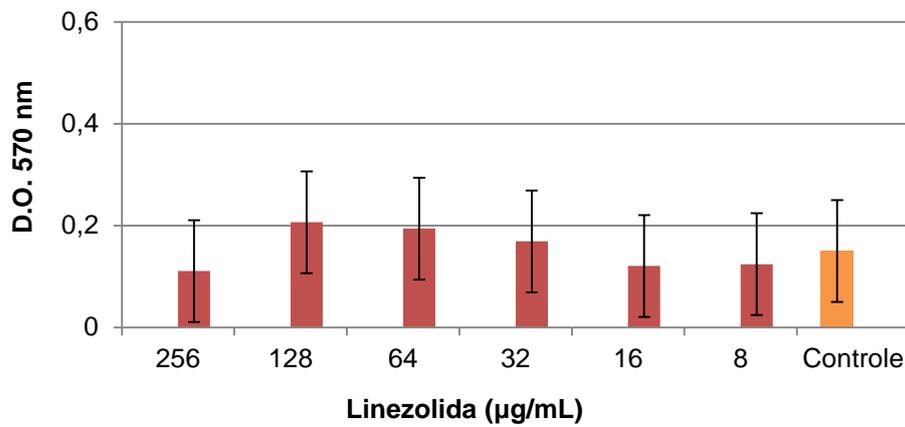


Figura 24 – Atividade inibitória da linezolidina sobre *M. abscessus* F2176 estruturada em biofilme.

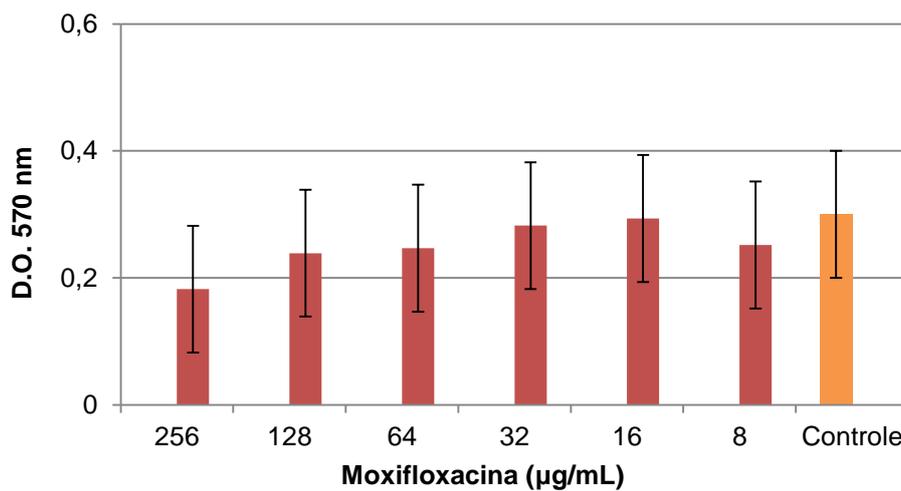


Figura 25 – Atividade inibitória da moxifloxacina sobre *M. abscessus* F2176 estruturada em biofilme.

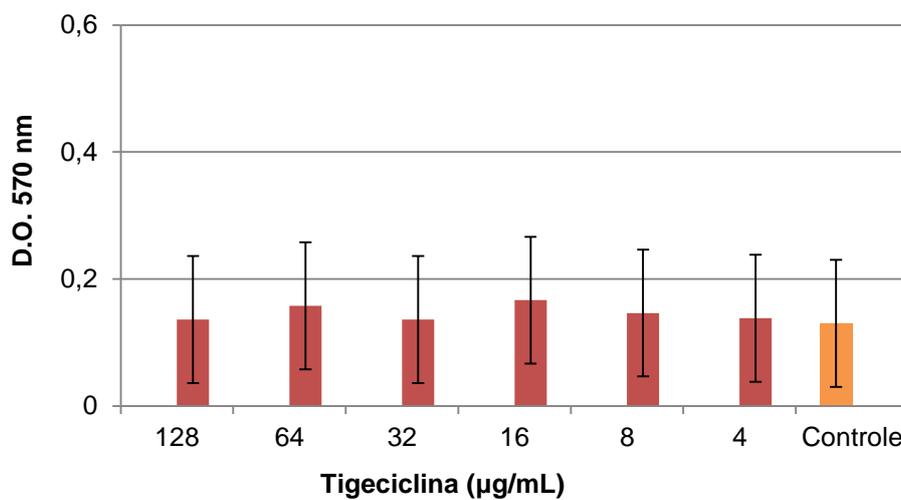


Figura 26 – Atividade inibitória da tigeciclina sobre *M. abscessus* F2176 estruturada em biofilme.

A **Figura 27** apresenta as taxas de crescimento bacteriano obtidas na avaliação de antimicrobianos no isolado clínico F2176.

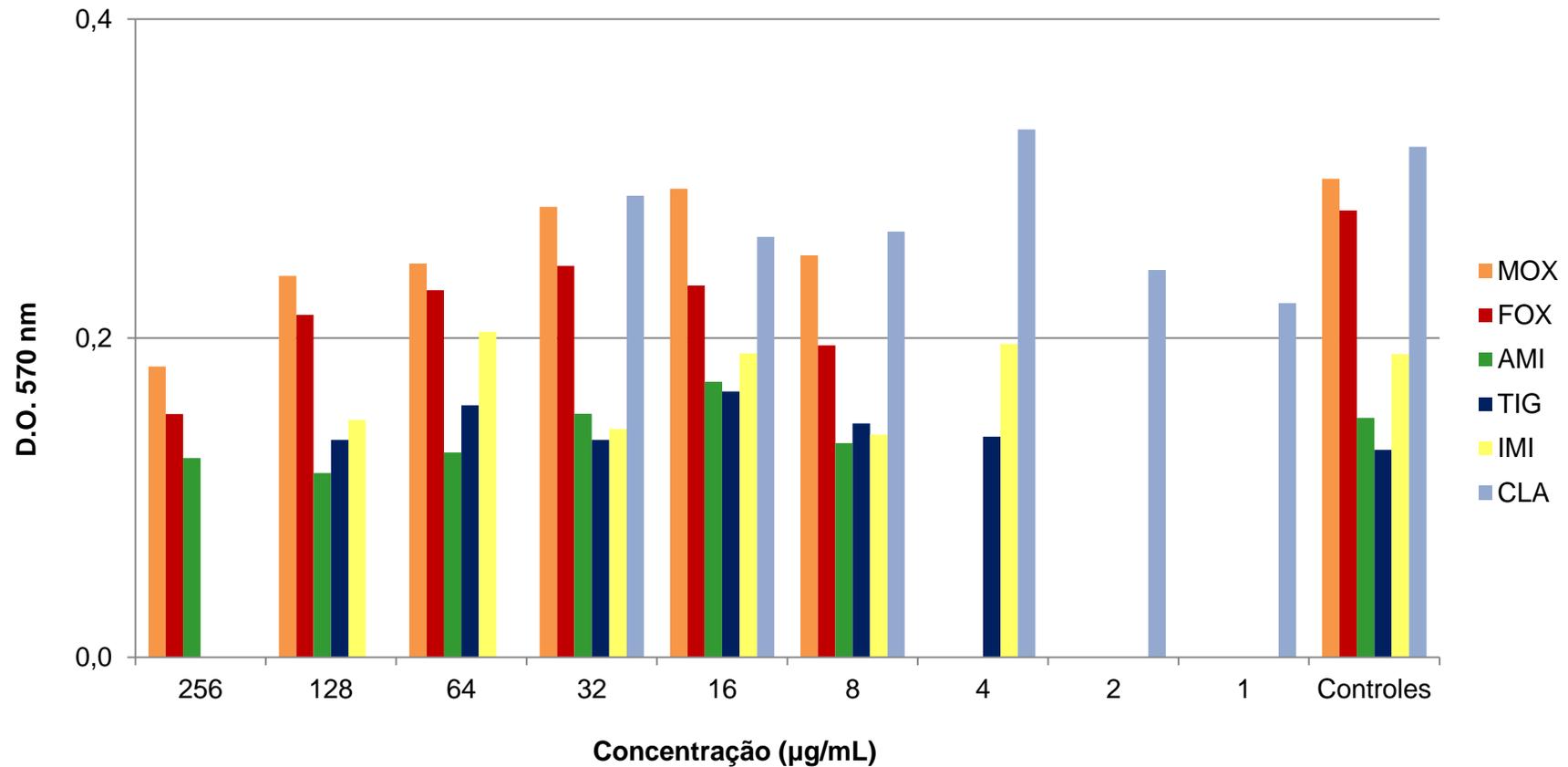


Figura 27 - Representação gráfica das taxas de crescimento bacteriano do isolado clínico F2176 frente aos antimicrobianos avaliados. Range dos antimicrobianos: moxifloxacina = 8 - 256 µg/mL; cefoxitina = 8 - 256 µg/mL; amicacina = 8 - 256 µg/mL; tigeciclina = 4 - 128 µg/mL; imipenem = 4 - 128 µg/mL e claritromicina = 1 - 32 µg/mL.

As **Figuras 28 a 34** mostram a taxa de crescimento bacteriano frente à antimicrobianos avaliando o isolado clínico F2534.

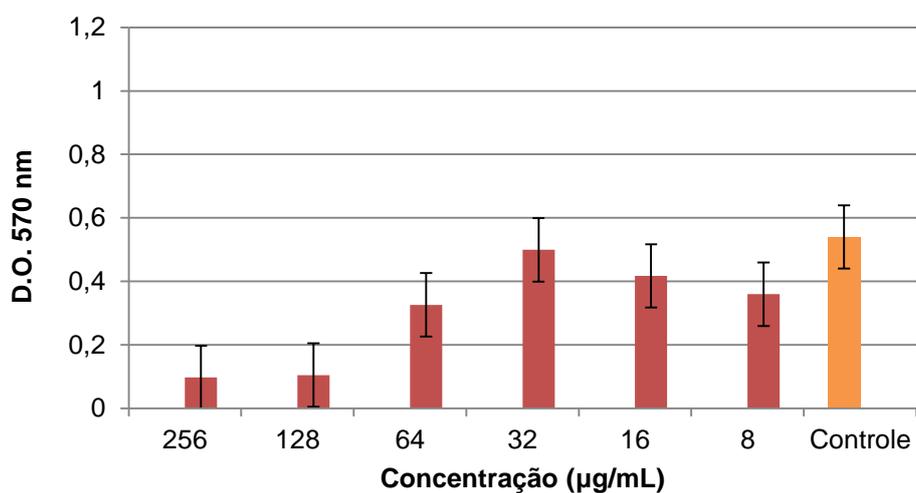


Figura 28 – Atividade inibitória da amicacina sobre *M. abscessus* F2534 estruturada em biofilme.

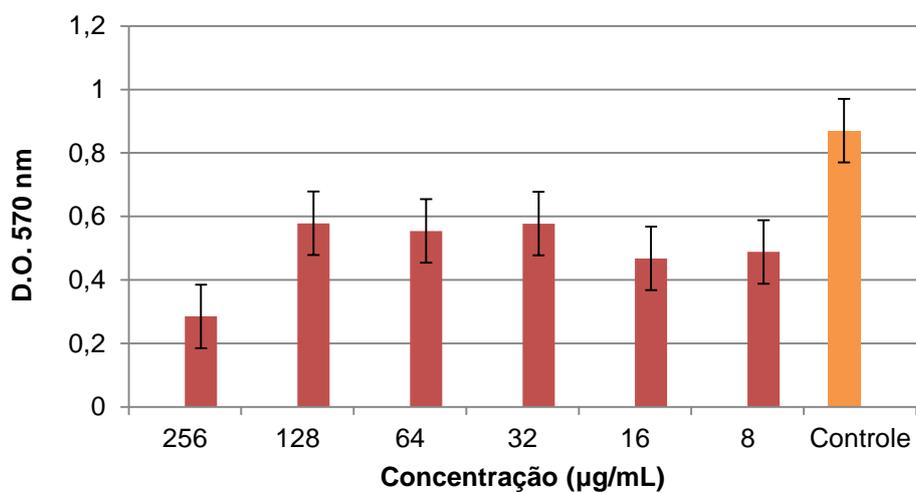


Figura 29 – Atividade inibitória da cefoxitina sobre *M. abscessus* F2534 estruturada em biofilme.

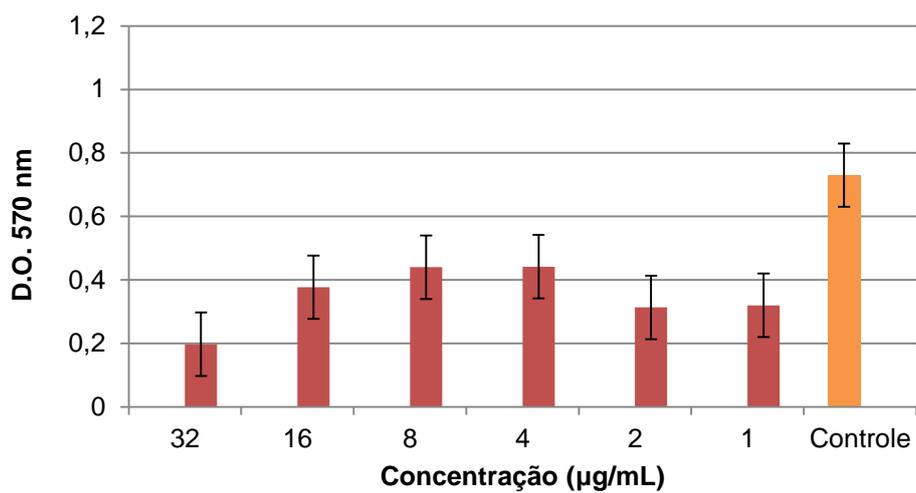


Figura 30 – Atividade inibitória da claritromicina sobre *M. abscessus* F2534 estruturada em biofilme.

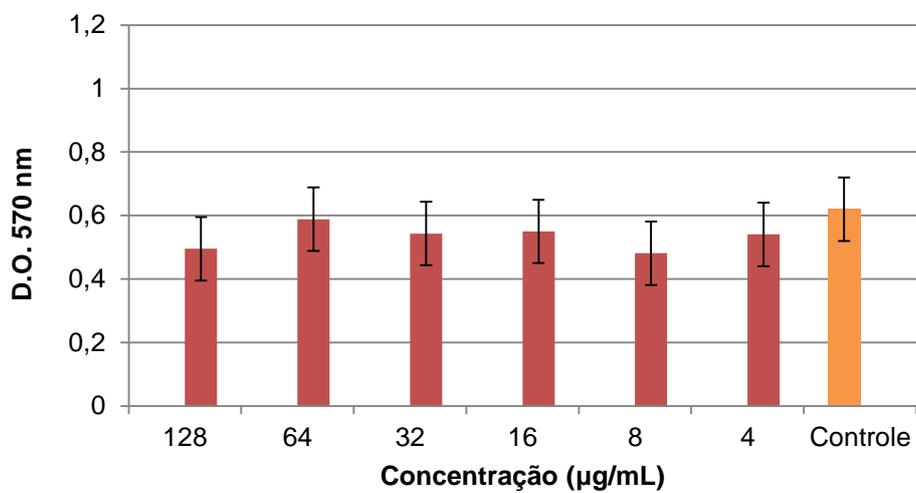


Figura 31 – Atividade inibitória de imipenem sobre *M. abscessus* F2534 estruturada em biofilme.

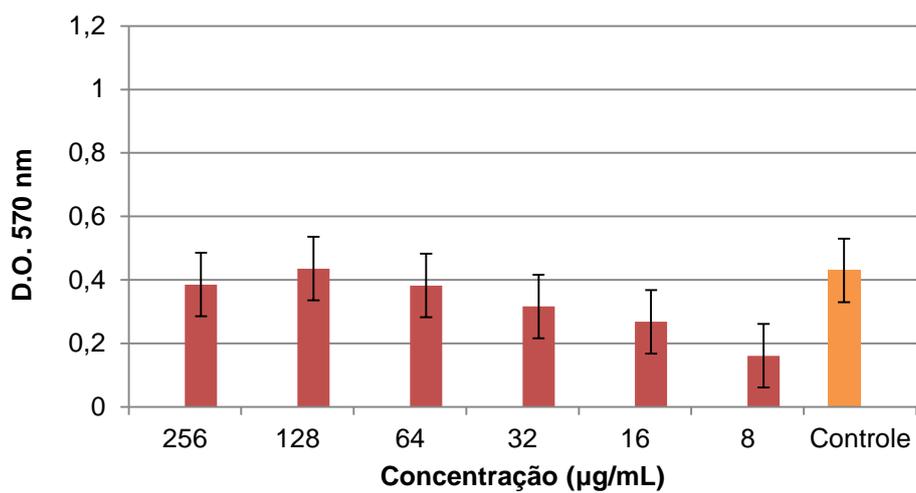


Figura 32 – Atividade inibitória da linezolidina sobre *M. abscessus* F2534 estruturada em biofilme.

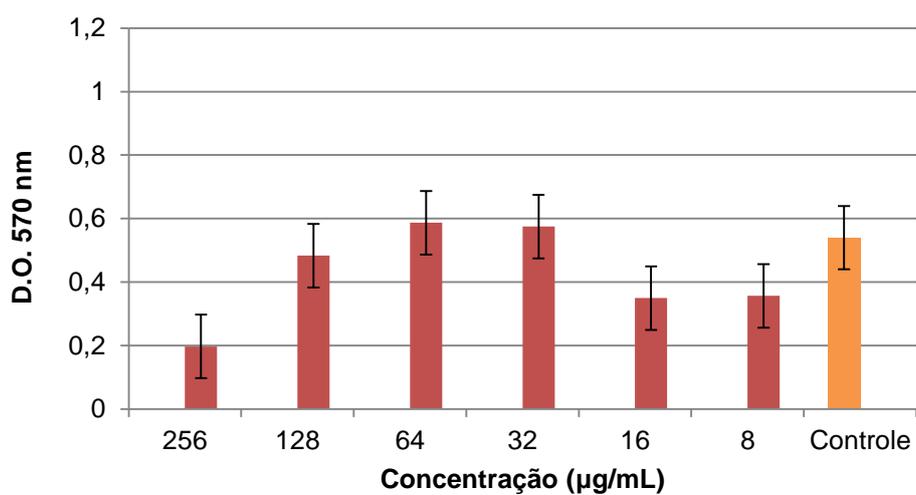


Figura 33 – Atividade inibitória da moxifloxacina sobre *M. abscessus* F2534 estruturada em biofilme.

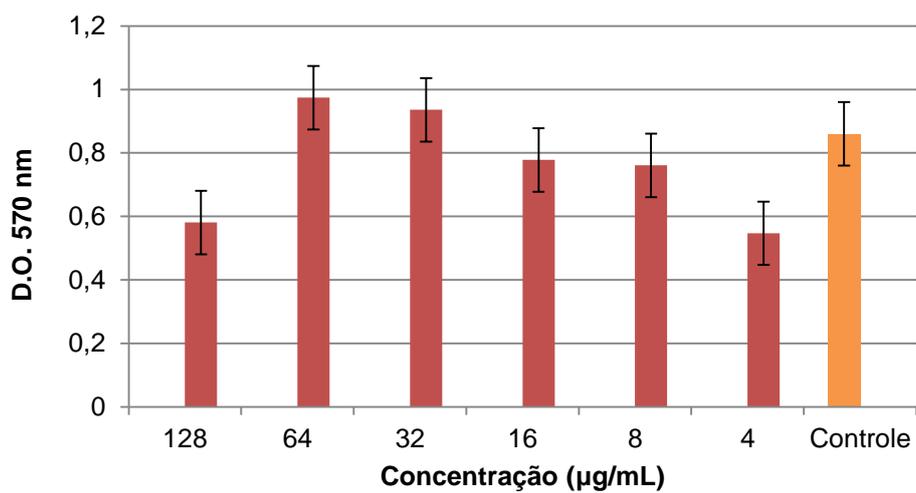


Figura 34 – Atividade inibitória tigeciclina sobre *M. abscessus* F2534 estruturada em biofilme.

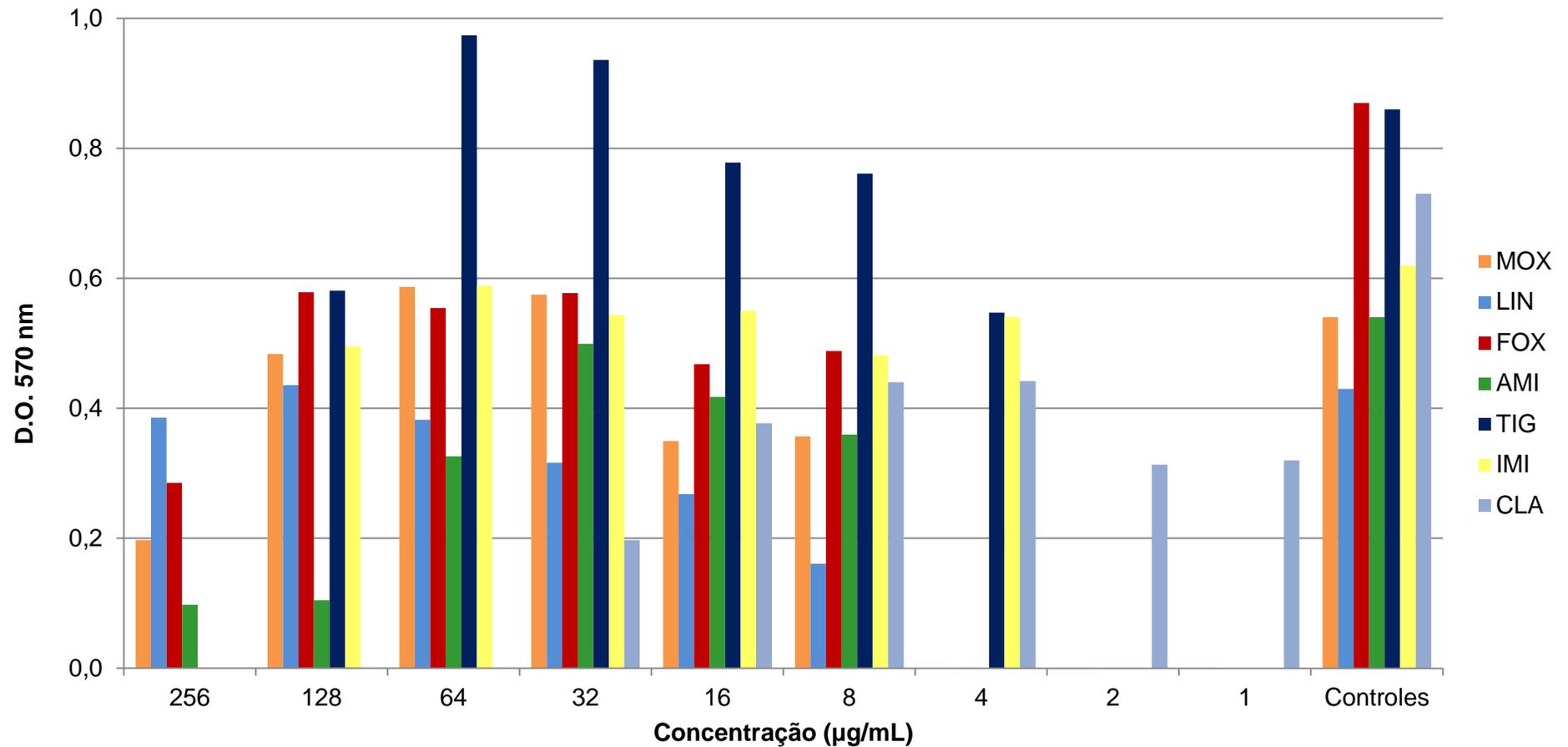


Figura 35 - Representação gráfica das taxas de crescimento bacteriano do isolado clínico F2534 frente aos antimicrobianos avaliados. Range dos antimicrobianos: moxifloxacina = 8 - 256 µg/mL; linezolida = 8 - 256 µg/mL; cefoxitina = 8 - 256 µg/mL; amicacina = 8 - 256 µg/mL; tigeciclina = 4 - 128 µg/mL; imipenem = 4 - 128 µg/mL e claritromicina = 1 - 32 µg/mL.

6. Atividade antimicrobiana contra *M. abscessus* internalizados em macrófagos

6.1. Cepa padrão *M. abscessus* ATCC 19977

A **Figura 36** mostra *M. abscessus* internalizadas em células Thp1 após 12 horas (**Figura 36A**) e 72 horas (**Figura 36B**) de infecção e exposição à amicacina na concentração de 256 µg/mL, corados pela técnica de Ziehl Neelsen.

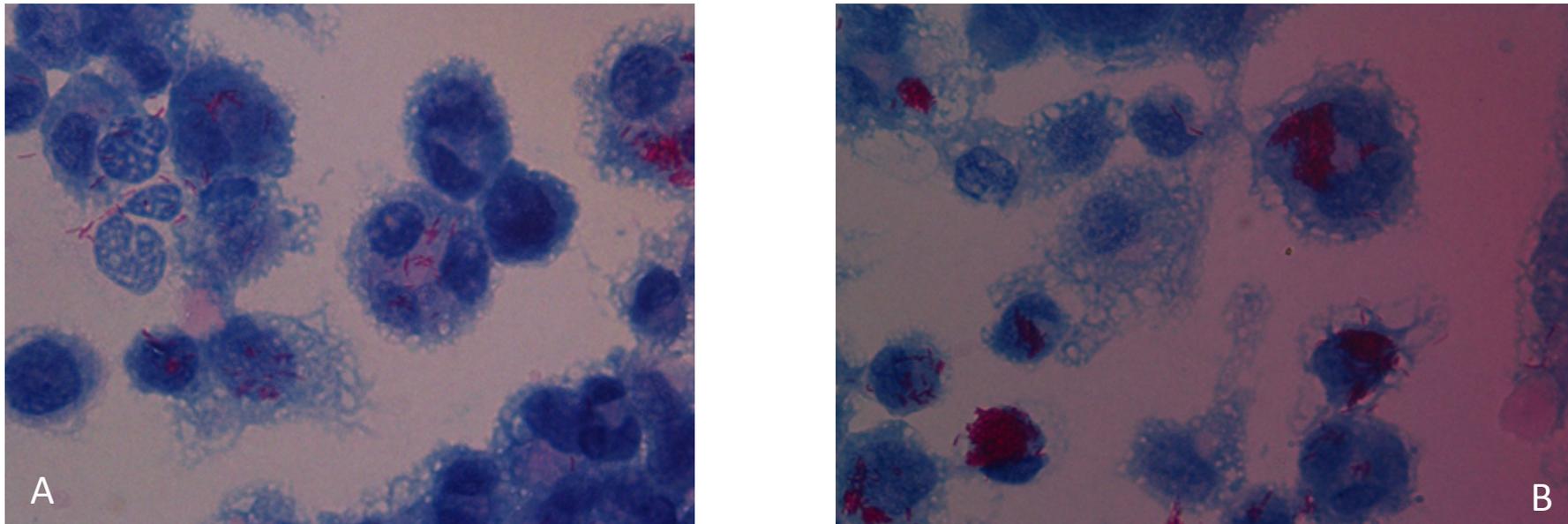


Figura 36 - Fotografia de células Thp1 infectadas com *M. abscessus* e expostas à amicacina por 12 horas (A) e 48 horas (B).
Resolução:400x

As **Figuras 37 a 43** mostra o resultado da sobrevivência de *M. abscessus* internalizadas em macrófagos e tratadas com diversas drogas por 72 horas.

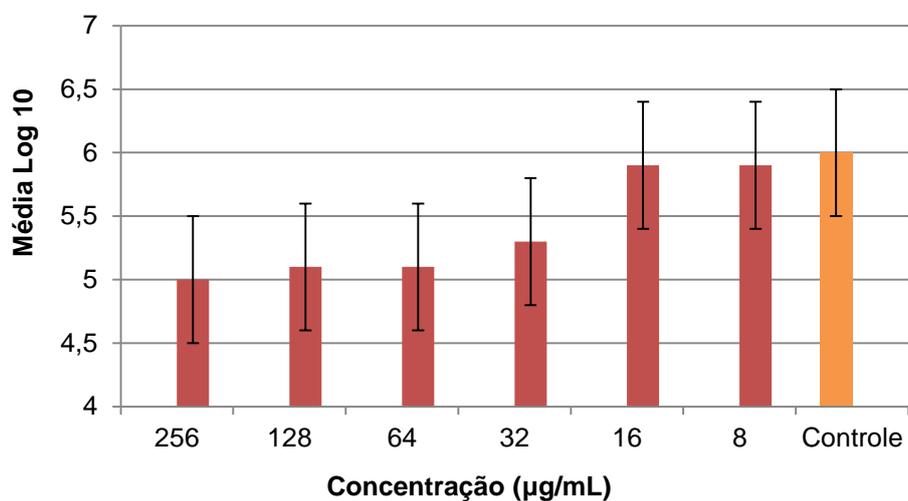


Figura 37 – Avaliação da ação bactericida da amicacina contra *M. abscessus* em compartimento intracelular (células Thp1)

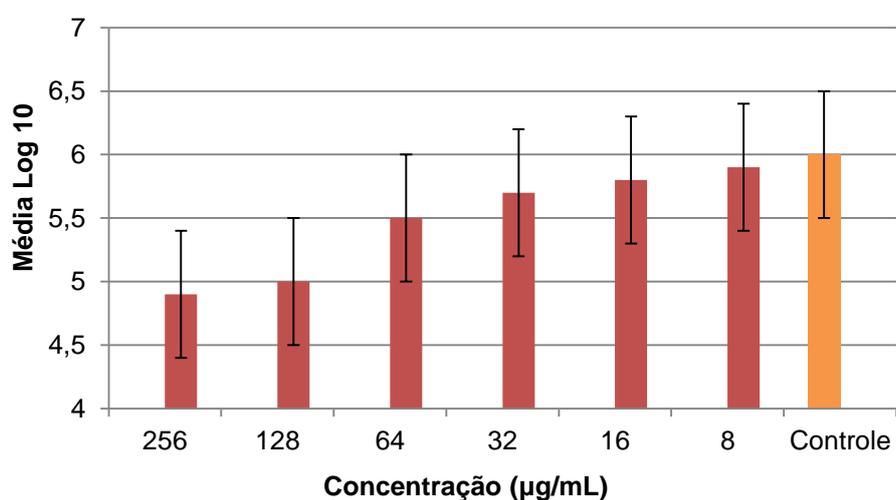


Figura 38 – Avaliação da ação bactericida da cefoxitina contra *M. abscessus* em compartimento intracelular (células Thp1).

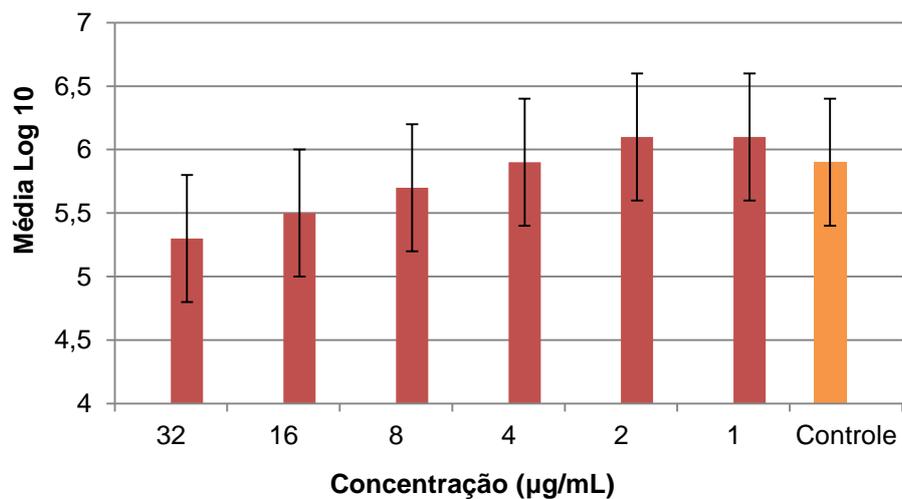


Figura 39 – Avaliação da ação bactericida da claritromicina contra *M. abscessus* em compartimento intracelular (células Thp1).

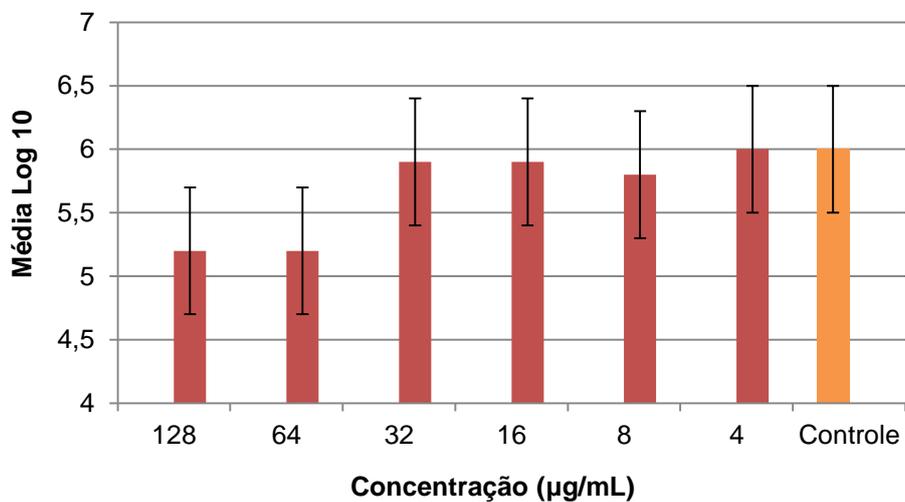


Figura 40 – Avaliação da ação bactericida do imipenem contra *M. abscessus* ATCC 19777 em compartimento intracelular (células Thp1).

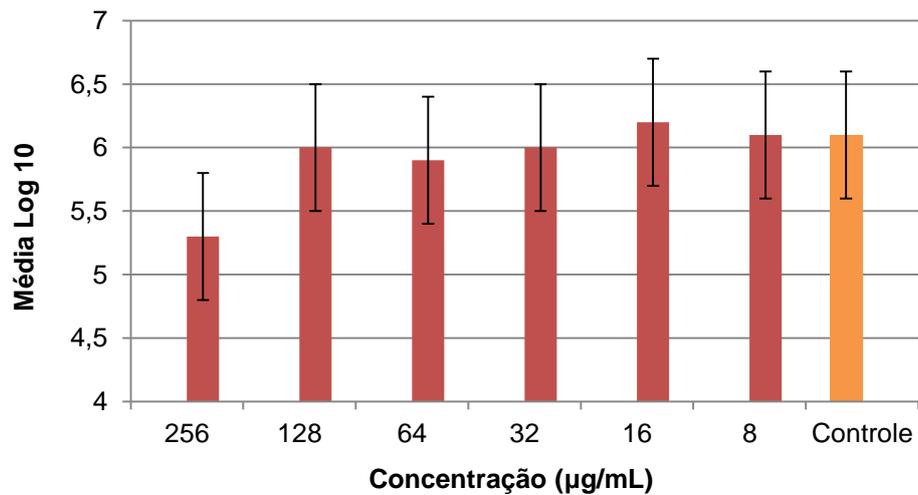


Figura 41 – Avaliação da ação bactericida da linezolida contra *M. abscessus* ATCC 19977 em compartimento intracelular (células Thp1).

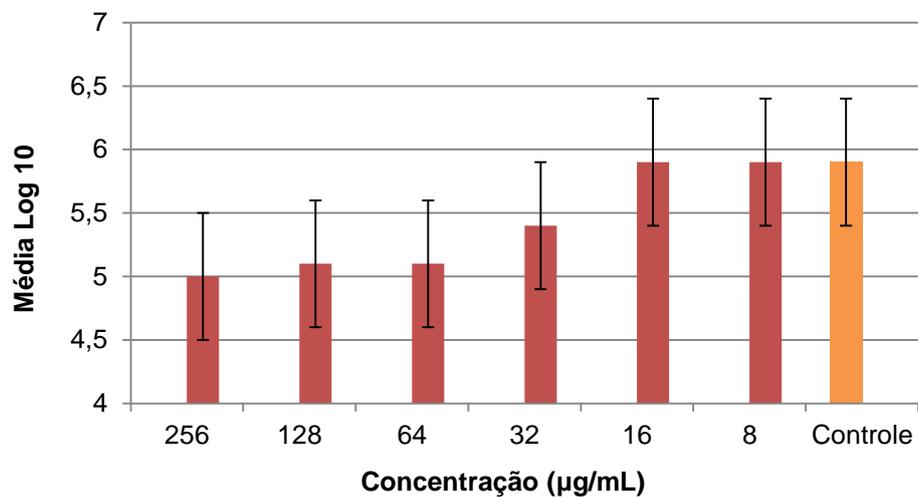


Figura 42 – Atividade inibitória da moxifloxacin sobre *M. abscessus* ATCC 19977 internalizados em macrófagos .

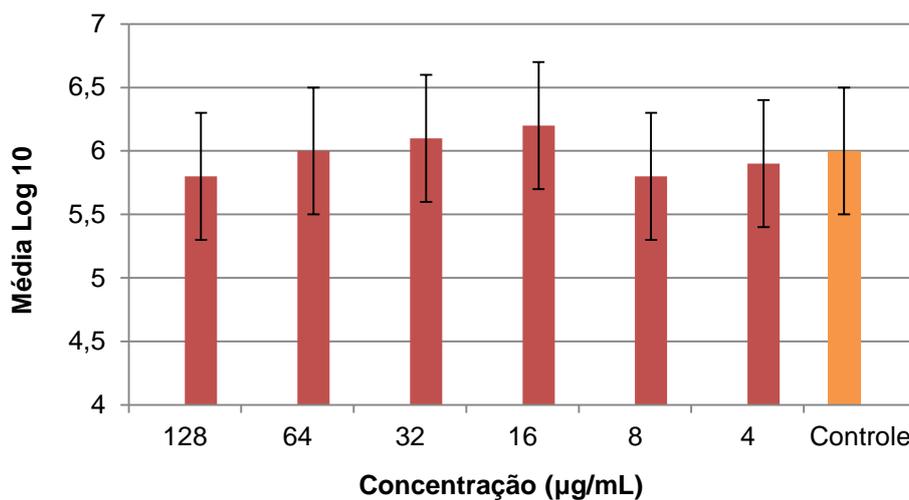


Figura 43 – Avaliação da ação bactericida da tigeciclina contra *M.abscessus* ATCC 19977 em compartimento intracelular (células Thp1).

As Figuras apresentadas a seguir mostram as taxas de sobrevivência de *M. abscessus* internalizadas em macrófagos e tratadas com diversas drogas por 72 horas avaliando a cepa padrão *M. abscessus* ATCC 19977 (Figura 44) e os isolados clínicos: F2176 (Figura 45), F2534 (Figura 46) e F2535 (Figura 47).

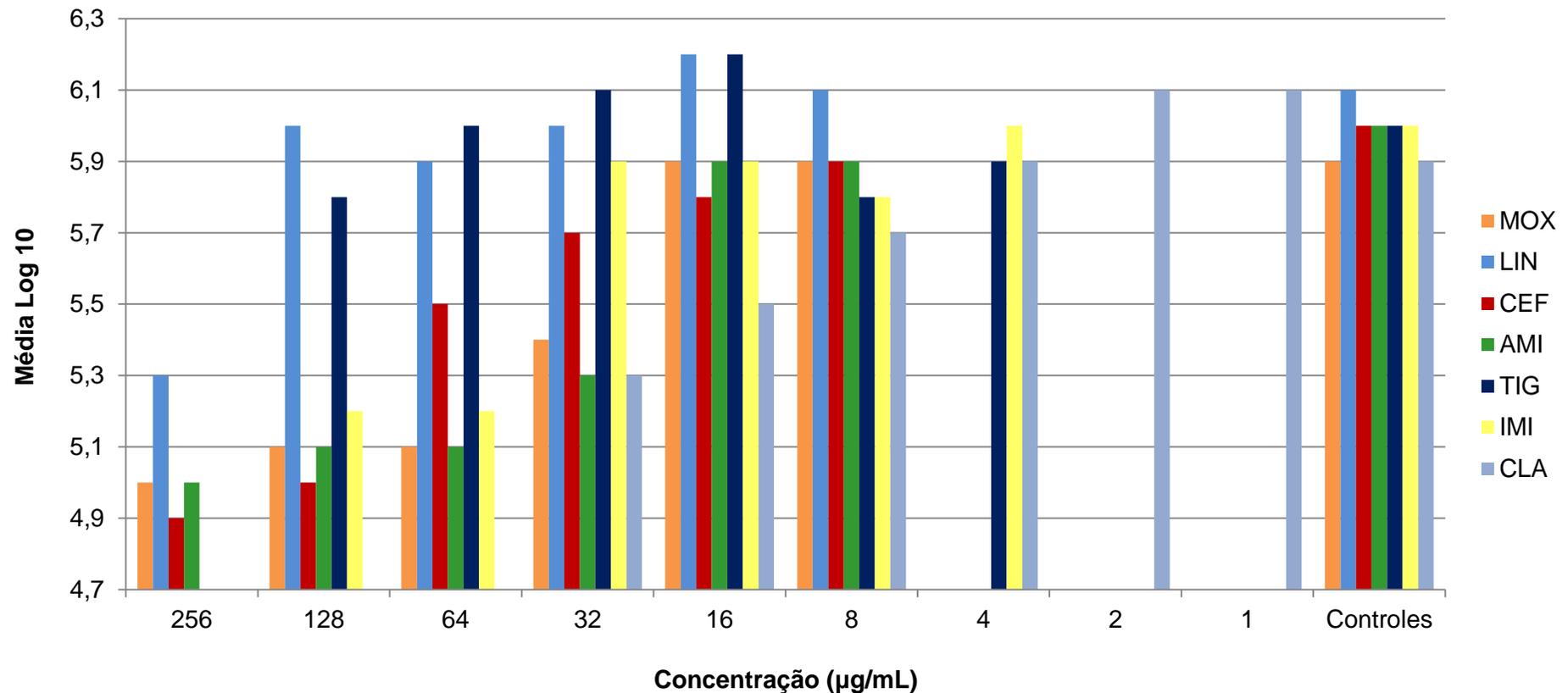


Figura 44 – Representação gráfica dos resultados da sobrevivência de *M. abscessus* internalizadas em macrófagos e tratadas com diversos antimicrobianos por 72 horas na cepa padrão ATCC 19977. Range dos antimicrobianos: moxifloxacina = 8 - 256 µg/mL; linezolidina = 8 - 256 µg/mL; cefoxitina = 8 - 256 µg/mL; amicacina = 8 - 256 µg/mL; tigeciclina = 4 - 128 µg/mL; imipenem = 4 - 128 µg/mL e claritromicina = 1 - 32 µg/mL.

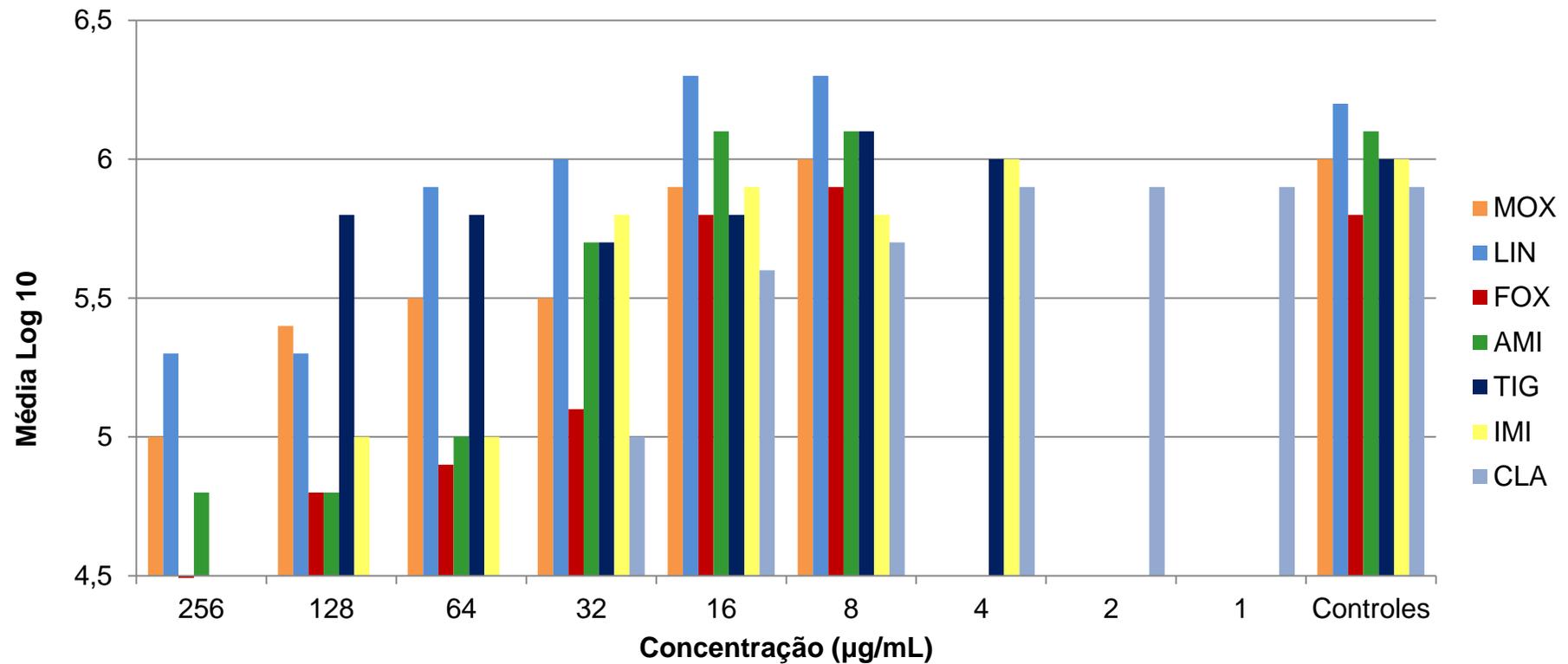


Figura 45 – Avaliação da ação bactericida de diferentes antimicrobianos contra *M. abscessus* F2176 em compartimento intracelular (células Thp1) após 72 horas de incubação. Range dos antimicrobianos: moxifloxacina = 8 - 256 µg/mL; linezolidina = 8 - 256 µg/mL; cefoxitina = 8 - 256 µg/mL; amicacina = 8 - 256 µg/mL; tigeciclina = 4 - 128 µg/mL; imipenem = 4 - 128 µg/mL e claritromicina = 1 - 32 µg/mL.

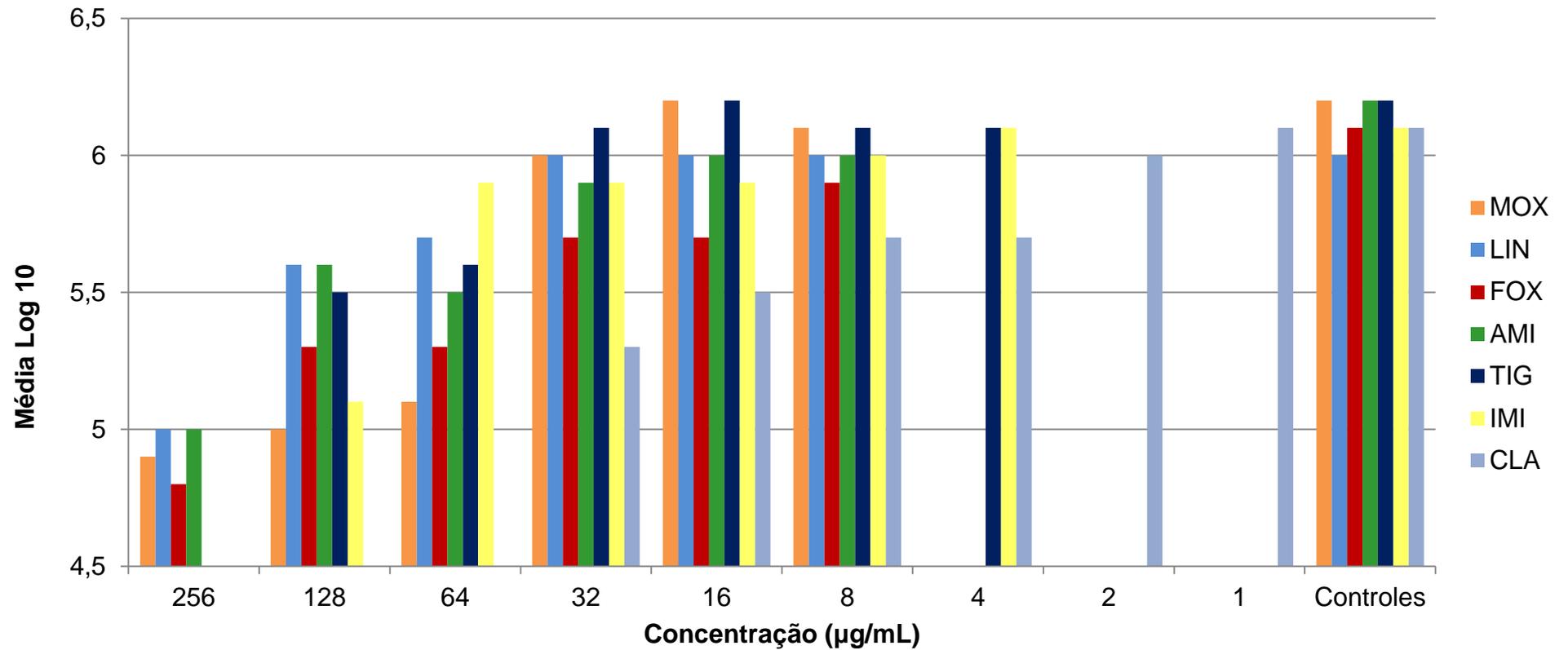


Figura 46 – Avaliação da ação bactericida de diferentes antimicrobianos contra *M. abscessus* F2534 em compartimento intracelular (células Thp1) após 72 horas de incubação. Range dos antimicrobianos: moxifloxacina = 8 - 256 µg/mL; linezolidina = 8 - 256 µg/mL; cefoxitina = 8 - 256 µg/mL; amicacina = 8 - 256 µg/mL; tigeclina = 4 - 128 µg/mL; imipenem = 4 - 128 µg/mL e claritromicina = 1 - 32 µg/mL.

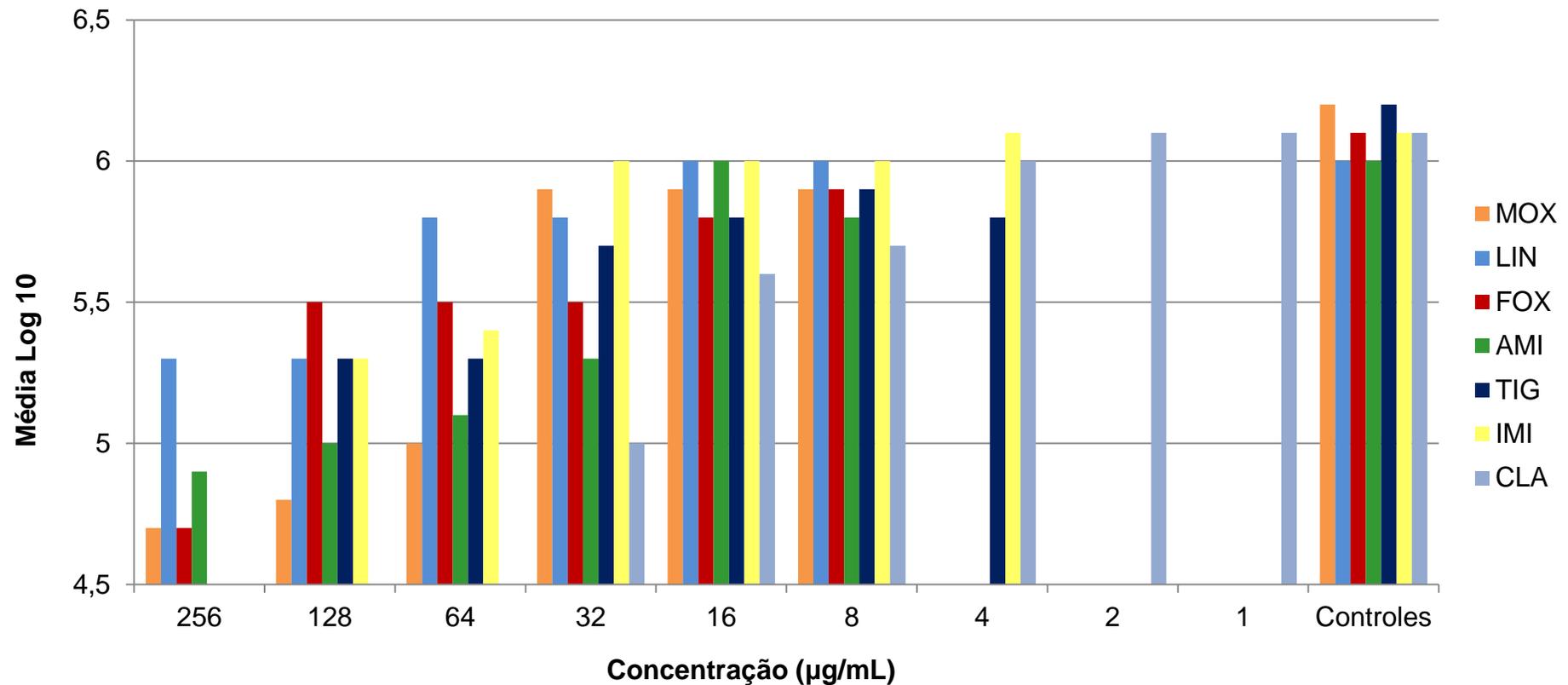


Figura 47 – Avaliação da ação bactericida de diferentes antimicrobianos contra *M. abscessus* F2535 em compartimento intracelular (células Thp1) após 72 horas de incubação. Range dos antimicrobianos: moxifloxacina = 8 - 256 µg/mL; linezolidina = 8 - 256 µg/mL; cefoxitina = 8 - 256 µg/mL; amicacina = 8 - 256 µg/mL; tigeciclina = 4 - 128 µg/mL; imipenem = 4 - 128 µg/mL e claritromicina = 1 - 32 µg/mL.

Imagens de células Thp1 infectadas pelo *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 nas figuras 48 e 49.

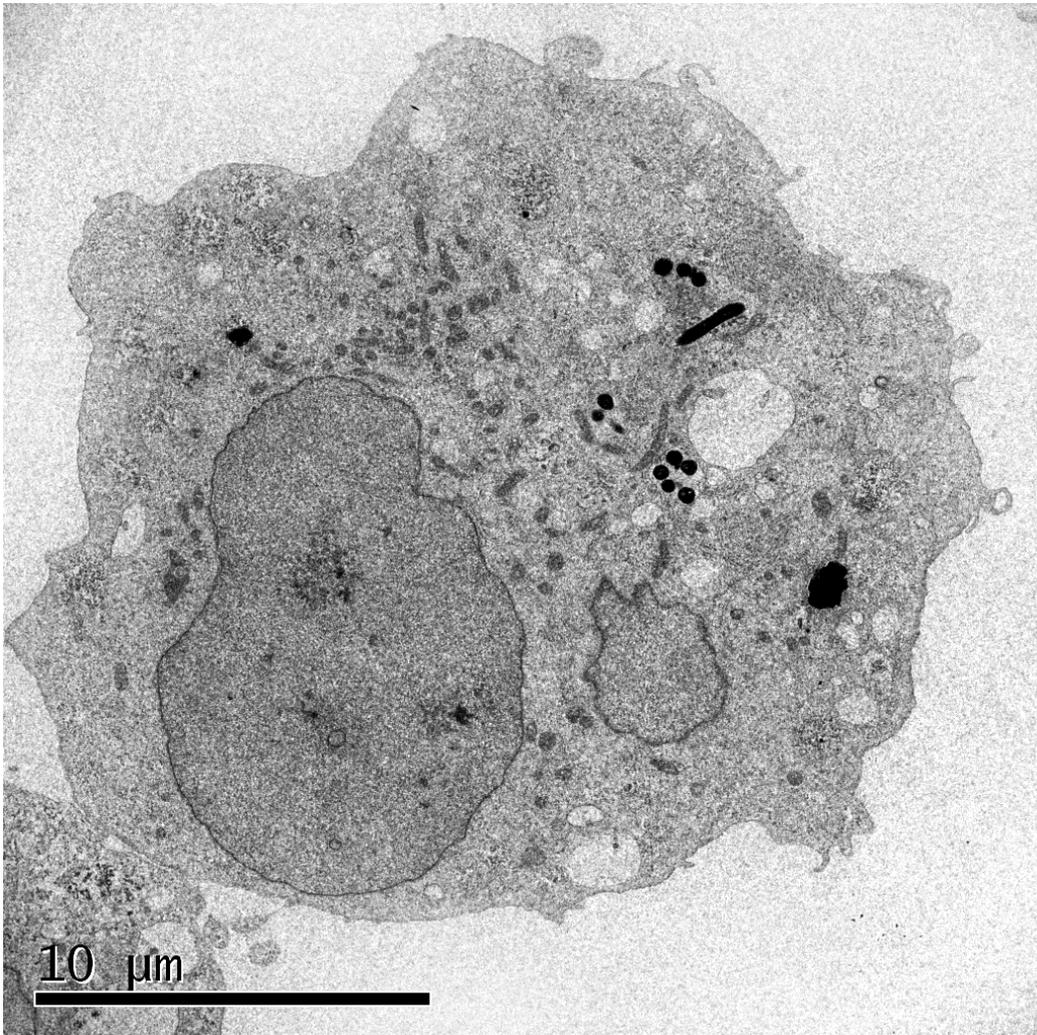


Figura 48. Visão panorâmica da *M. abscessus* fagocitado pelo macrófago

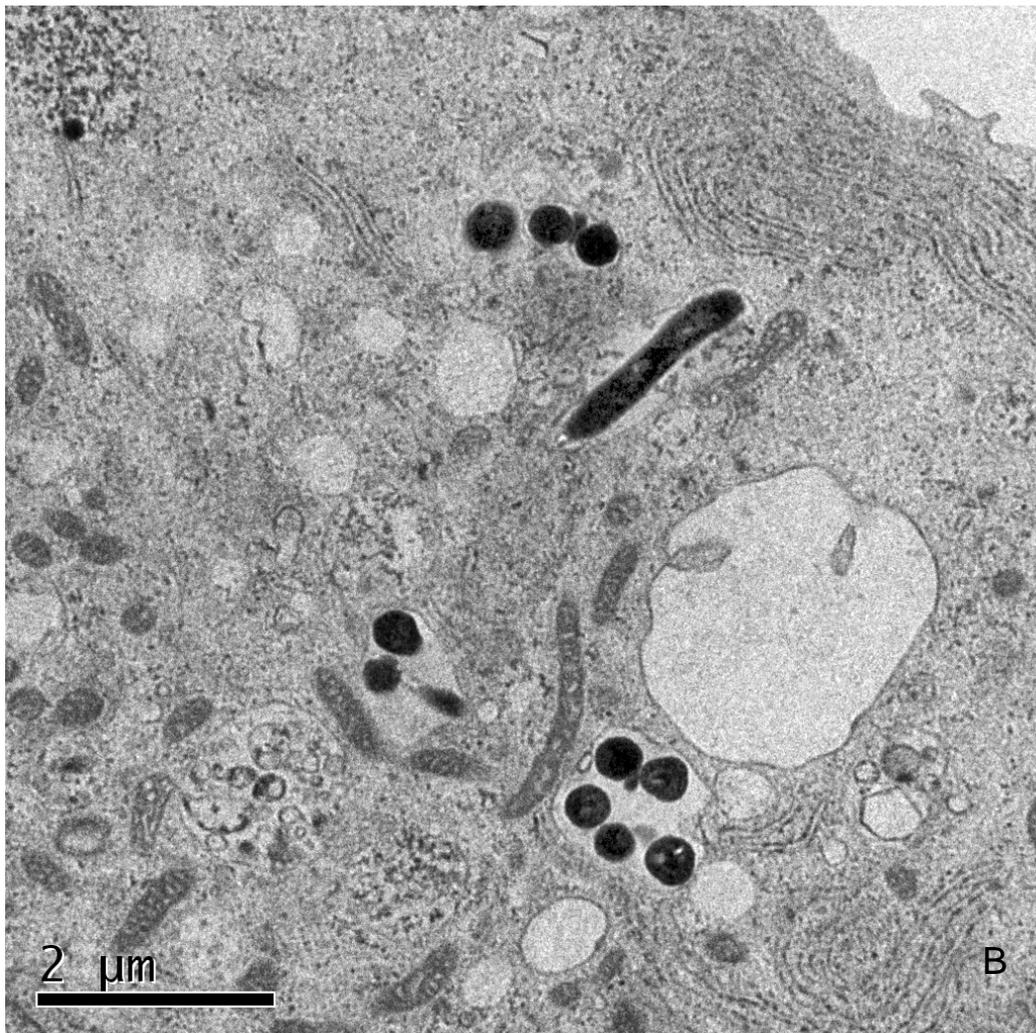


Figura 49. Visão aproximada com o bacilo dentro do macrófago e com a membrana do fagossomo bem definido.

Visando caracterizar se *M. abscessus* ATCC 19977 durante a interação com macrófagos escapa para o citoplasma ou permanece no fagossomo, macrófagos infectados foram fixados 24 horas após infecção e tratamento com amicacina. Foram a seguir analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Foram examinadas as células presentes no bloco e em todas pode ser observada a localização em fagossomos (Figuras 48 e 49).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

As infecções pulmonares causadas por *M. abscessus* subsp. *abscessus* consistem num desafio terapêutico, seja pelo limitado arsenal antimicrobiano, seja pela sua localização em macrófagos. Um conjunto de fatores contribui para esse cenário. A complexa barreira de proteção, que é a parede celular micobacteriana, dificulta a entrada dos fármacos. Outros dois fatores são a resistência intrínseca aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose e a limitada penetração dos antimicrobianos, ativos *in vitro* contra micobactérias, nos lisossomos. Antes de alcançar a bactéria que se encontra dentro do fagossomo com pH muito baixo, em geral, diferente do pH ideal para ação antimicrobiana, os fármacos necessitam atravessar pelo menos duas membranas, a membrana plasmática e a membrana do fagossoma (VERGNE et al., 2004). Além disso, é possível que no lúmen do trato respiratório a formação de biofilme seja outro fator limitante para a cura microbiológica (Griffith et al., 2007).

A dificuldade dos antimicrobianos de atingirem a concentração adequada dentro da célula eucariótica (TULKENS, 1991), de agirem em diferentes pH dos diferentes compartimentos celulares, somada à habilidade da micobactéria de sobreviver à ação da célula fagocitária dificultam a ação dos fármacos atualmente disponíveis. Esse panorama impulsiona a busca por novas drogas e alternativas de tratamento de infecções por *M. abscessus*.

O teste de *checkerboard* é um dos principais métodos para avaliação de sinergismo, para pesquisar atividade inibitória *in vitro* de combinações de

antimicrobianos (MOODY, 2007). Esse método foi utilizado para avaliar todas as combinações entre fármacos com ou sem atividade contra *M. abscessus*, anti-inflamatório e inibidores de betalactamases no presente estudo.

As combinações de antimicrobianos com diclofenaco não apresentaram efeito sinérgico ou antagônico. Não há na literatura publicações sobre a atividade desse composto contra *M. abscessus*, embora efeito sinérgico tenha sido demonstrado por Dutta em 2007 para a combinação de estreptomicina e diclofenaco contra *M. tuberculosis in vivo*. Além de não haver efeito sinérgico *M. abscessus* ATCC 19977 e dois isolados clínicos apresentaram CIMs elevadas, sugerindo resistência intrínseca. Considerando que o mecanismo conhecido da atividade antimicrobiana do diclofenaco é inibir a síntese de DNA, o estudo do mecanismo de resistência ao diclofenaco poderá contribuir para a descoberta de novos fármacos com atividade antimicrobiana.

Os betalactâmicos imipenem, ceftazidima e meropenem foram avaliados em combinação com os inibidores de betalactamases clavulanato e tazobactam. Embora o efeito da atividade *in vitro* de betalactâmicos combinados com tazobactam contra MNT tenha sido relatado (KWON; TOMIOKA; SAITO, 1995), assim como o aumento da ação da ceftazidima em associação com sulbactam contra *M. smegmatis* (SHRIVASTAVA; SHUKLA; CHAUDHARY, 2009), neste estudo, as CIMs com inibidores foram iguais às aquelas sem inibidores. Há duas possibilidades principais para explicar esse achado. Uma delas é a ausência de betalactamases em *M. abscessus* e a outra é a presença de betalactamases não inibidas por esses compostos. A associação de inibidores de betalactamases e betalactâmicos foi avaliada

neste estudo, pois já havia sido demonstrada a atividade antimicrobiana da associação meropenem/clavulanato contra *M. tuberculosis* (HUGONNET; BLANCHARD, 2007), e a presença de betalactamases já havia sido demonstrada em *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* e *M. tuberculosis* (FLORES; PARSONS; PAVELKA, 2005; KASIK; PEACHAM, 1968; WALLACE et al., 1985).

Sulfametoxazol/Trimetoprim nas concentrações iniciais de 152-0,1/8-0,01 µg/mL foi avaliada em combinação com claritromicina, amicacina, linezolida e tigeciclina contra *M. abscessus*. As CIMs para os quatro fármacos em combinação com sulfametoxazol/trimetoprim foram iguais aos pontos dos fármacos quando testados isoladamente. Uma das explicações para a ausência de atividade antimicrobiana do sulfametoxazol pode ser a presença de plasmídios com integron classe 1, que codificam o gene *sul*, como demonstrado recentemente por nosso grupo – depósito GenBank CP003505.

Na análise das combinações dos quatro fármacos entre si (linezolida, amicacina, claritromicina e tigeciclina), a combinação entre claritromicina e linezolida apresentou redução de uma diluição na CIM, embora não tenha sido suficiente para ser considerado um efeito sinérgico. Por outro lado, nas demais combinações houve estabilidade das CIMs. Resultados diferentes foram encontrados por Huang e colaboradores em estudo com 34 isolados de *M. abscessus*, quando avaliaram a atividade de tigeciclina com amicacina e claritromicina. Na combinação de tigeciclina com amicacina foi observado sinergismo em 7,1% de *M. abscessus* e antagonismo em 35,7%, em contraste a combinação de tigeciclina com claritromicina apresentou efeito sinérgico de 93% dos isolados de *M. abscessus* (HUANG, C. W. et al., 2013).

Durante a padronização da técnica de biofilme foi testado, inicialmente, o meio de cultura MH, porém a formação de biofilme nos pinos imersos era praticamente invisível após as três lavagens com PBS. Na tentativa de produzir biofilme, foram realizados testes com meio 7H9 suplementado com OADC, também sem a obtenção de bons resultados. Diante dessa dificuldade foi formulado no próprio laboratório, o Meio de Sauton. Neste meio o crescimento foi satisfatório e então, foi escolhido para os testes com os antimicrobianos no presente estudo. Os pinos com biofilmes foram expostos à amicacina, claritromicina, cefoxitina, imipenem, moxifloxacino, linezolida ou tigeciclina em concentrações que variaram desde as indicadas pelo CLSI como também em concentrações mais elevadas. A sobrevivência de *M. abscessus* diante de concentrações elevadas, destaca a necessidade de estudos da CIM em biofilmes. Em todas as concentrações de antimicrobianos testados contra biofilme foi possível recuperar células viáveis.

Observou-se que em concentrações mais elevadas de drogas e densidade óptica em torno de 0,2 as bactérias demoraram mais de 3 dias para apresentarem crescimento visível, enquanto nos poços onde os biofilmes foram testados em concentrações mais baixas, em três dias, já se observava o crescimento em meio sólido. Os biofilmes recuperados de acordo com o aumento das concentrações onde haviam sido submetidos, cresceram mais lentamente em meio sólido. Com uma grande variação entre os valores para cada pino, é difícil escolher um antimicrobiano com boa atividade contra biofilme.

O comportamento de micobactérias durante infecção pulmonar, especificamente com *Mycobacterium tuberculosis*, é bastante conhecido, uma

vez dentro de fagossomas com baixo pH, esta impede a acidificação inibindo a fusão com o lisossomo e além disso conseguem escapar do fagossomo para o citoplasma (DE BACKER, 2007; HELKE; MANKOWSKI; MANABE, 2006; PIETERS, 2008).

Os resultados deste estudo mostram que a *M. abscessus* sobrevive bem no interior de macrófagos e que em 24 horas após a infecção mantém-se no fagossomo, sem escapar para o citoplasma. Os antimicrobianos, nas concentrações inibitórias obtidas por microdiluição, quando aplicados nos testes com células, não apresentaram efeito inibitório sobre as bactérias, uma vez que o número de UFC das células controle sem fármaco e células com fármacos foi o mesmo. A concentração na qual foi obtida inibição contra *M. abscessus* encontrava-se muito acima dos níveis terapêuticos e, portanto, fora da faixa aceitável para aplicação em indivíduos infectados. A atividade combinada de imipenem e claritromicina ou amicacina contra *M. abscessus* foi avaliada em estudos anteriores. Imipenem mostrou efeito sinérgico com claritromicina em 43% dos isolados e indiferente com amicacina em 90% dos isolados (MIYASAKA et al., 2007). Pacientes com infecção pulmonar por *M. abscessus* foram tratados com amicacina e cefoxitina no primeiro mês, além de claritromicina, ciprofloxacina e doxiciclina por 12 meses, no entanto, em apenas 58% dos pacientes com baciloscopia positiva do escarro houve negatificação por mais de um ano. Por dificuldade de tolerar a cefoxitina, este foi substituído por imipenem (JEON et al., 2009). O mesmo esquema foi utilizado em Taiwan para o tratamento de doença pulmonar por *M. abscessus*. Nesse caso, ciprofloxacina foi substituído por levofloxacina. Após um ano de tratamento, 27,3% continuaram com sintomas da infecção ou morreram em função da

infecção por *M. abscessus*. Em 32,8% manteve-se a positividade da cultura de escarro para *M. abscessus*. Após o tratamento, 32,5% e 12,5% dos isolados de *M. abscessus* recuperados permaneciam sensíveis a cefoxitina e imipenem (HUANG, Y. C. et al., 2010). Em outro estudo amicacina foi usada em média por 230 dias e cefoxitina ou imipenem por 83 dias em pacientes tratados. A taxa de sucesso no tratamento foi de 80% mas apresentaram efeitos colaterais como lesão hepática e audição prejudicada em 44% dos pacientes (LYU et al., 2011).

Os isolados clínicos F2176, F2534 e 2535 apresentaram comportamento semelhante àquele da cepa *M. abscessus* ATCC 19977 quando internalizados em macrófagos, diminuindo as taxas de crescimento apenas em concentrações elevadas.

A sobrevivência de *M. abscessus* em biofilmes e dentro de macrófagos quando submetidas a tratamento com elevadas concentrações de antimicrobianos, chama a atenção para a capacidade de *M. abscessus* sobreviver nesses dois ambientes.

A sobrevivência de *M. abscessus*, no interior de macrófagos expostos a concentrações terapêuticas de antimicrobianos e em concentrações muito acima desses níveis indicam que a ação bactericida do macrófago é essencial nas infecções por essa espécie, e que podem explicar a frequentemente ocorrência de falha terapêutica observada clinicamente.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Todos os isolados testados foram sensíveis à tigeciclina.

Todas as associações de antimicrobianos, diclofenaco ou de betalactâmicos/inibidores de betalactamases foram indiferentes.

A atividade dos antimicrobianos contra *M. abscessus* estruturados em biofilme foi apenas bacteriostática.

O efeito dos antimicrobianos contra *M. abscessus* quando localizadas em fagossomas é apenas bacteriostático.

M. abscessus ATCC 19977 permanece no fagossomo 24 horas após infecção de macrófagos.

REFERÊNCIAS

ADEKAMBI, T. D. M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. . **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, , v. 54, p. 2095-105, 2004.

ADEKAMBI, T. P. B., D.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. . rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 133-43, 2006.

ADEKAMBI, T. P. C., M.; DRANCOURT, M. . rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. . **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5699-708, 2003.

ADEKAMBI, T. R.-G., M.; GREUB, G.; GEVAUDAN, M. J.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5493-501, 2004.

ADJEI, M. D. H., T. M.; DECK, J.; FREEMAN, J. P.; WILLIAMS, A. J.; SUTHERLAND, J. B. . Acetylation and nitrosation of ciprofloxacin by environmental strains of mycobacteria. **Can. J. Microbiol.**, v. 53, n. 1, p. 144-47, 2007.

BELISLE, J. T.; SHANKAR, S. American Society for Microbiology. Quorum sensing by *Mycobacterium tuberculosis*. **Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.**, 1999.

BELLINZONI, M. B. S. S., F.; RICCARDI, G.; DE ROSSI, E.; ALZARI, P. M. Structural plasticity and distinct drug-binding modes of LfrR, a mycobacterial efflux pump regulator. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 24, p. 7531-37, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3ªed. Rio de Janeiro; 2005.

BRENNER, J. D.; KRIEG, R. N.; STALEY, T. J. Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria: introductory essays. **New York: Springer**, v. 2, 2005.

BROWN-ELLIOTT, NASH A.; WALLACE, R. J., JR. . Antimicrobial Susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 3, p. 545-82, 2012.

BROWN-ELLIOTT, B. A. W., R. J., JR. . Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. . **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 716-46, 2002.

CERI, H. O., M. E.; STREMIK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. . **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 6, p. 1771-6, 1999.

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; UEKY, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; DURHAM, A. M.; ARBEIT, R. D.; LEÃO, S. C. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 48, 2008.

CLEMENS, D. L. H., M. A. . The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1349-55, 1996.

CLSI. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. CLSI document M24-A.** 2003.

DALEY, C. L. G., D. E. . Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. **Clin. Chest. Med.**, v. 23, p. 623-32, 2002.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. . **Respir. Méd**, v. 100, p. 1862-70, 2006.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE G, A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 4, p. 847-67, Dec 2000. ISSN 1092-2172 (Print)

1092-2172 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11104821>.

DAVID, H. V., V.; THOREL, M. F. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. 1989.

DAVIES D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews**; V. 2 2003.

DE BACKER, A. I. M., K. J.; VAN DEN HEUVEL, E.; VANSCHOU BROECK, I. J.; KOCKX, M. M.; VAN DE VYVERE, M. Tuberculous adenitis: comparison of CT and MRI findings with histopathological features. . **Eur. Radiol.**, , v. 17, p. 1111-117, 2007.

DERETIC, V. D., M.; VERGNE, I.; MASTER, S.; DE HARO, S.; PONPUAK, M.; SINGH, S. . Autophagy in immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: a model system to dissect immunological roles of autophagy. . **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 335, p. 169-88, 2009.

DONLAN, R., M. . Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 8, p. 1387-392, 2001.

DUNNE JR. WM. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clin. Microbiol. Rev**; v. 15(2): p. 115-66. 2002

DUTTA N, et al. Activity of diclofenac used alone and in combination with streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **International Journal of Antimicrobial Agents.**, v. 30, p. 336-40, 2007.

ESTEBAN, J. et al. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 184, Oct 17 2008. ISSN 1471-2180 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18928544 >.

EUZÉBY JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. [acesso em 31 Junho de 2013]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>).

FATTORINI, L. O., G.; JIN, SH.; SCARDACI, G.; AMICOSANTE, G.; FRANCESCHINI, N.; CHOPRA, I. Resistance to beta-lactams in *Mycobacterium fortuitum*. . **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, n. 5, p. 1068-072, 1992.

FLORES, A. R.; PARSONS, L. M.; PAVELKA, M. S., JR. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 2, p. 521-32, Feb 2005. ISSN 1350-0872 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15699201 >.

GREENDYKE, R.; BYRD, T. F. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 6, p. 2019-26, Jun 2008. ISSN 1098-6596 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18378709 >.

GRIFFITH, D. E., T. AKSAMIT, et al. (2007). "An Official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases." **Am J Respir Care Med** 175(4):367-416. 2007

HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. V. 2: p. 95-108. 2004.

HELKE, K. L.; MANKOWSKI, J. L.; MANABE, Y. C. Animal models of cavitation in pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 86, n. 5, p. 337-48, Sep 2006. ISSN 1472-9792 (Print)

1472-9792 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16359922 >.

HENRICI, A. T. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. **J Bacteriol**, v. 25, n. 3, p. 277-87, Mar 1933. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16559616 >.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9^aed. Baltimore; Williams & Wilkins, p. 597-603, 1994.

HOWARD, S. T. et al. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 6, p. 1581-90, Jun 2006. ISSN 1350-0872 (Print)

1350-0872 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16735722 >.

HUANG, C. W. et al. Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n. 3, p. 218-23, Mar 2013. ISSN 1872-7913 (Electronic)

0924-8579 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23312605 >.

HUANG, Y. C. et al. Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 43, n. 5, p. 401-6, Oct 2010. ISSN 1995-9133 (Electronic)

1684-1182 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21075707 >.

HUGONNET, J. E.; BLANCHARD, J. S. Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate. **Biochemistry**, v. 46, n. 43, p. 11998-2004, Oct 30 2007. ISSN 0006-2960 (Print). Disponível em:

<
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17915954 >.

JARLIER, V.; GUTMANN, L.; NIKAIDO, H. Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 9, p. 1937-9, Sep 1991. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1952873>.

JEON, K. et al. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 180, n. 9, p. 896-902, Nov 1 2009. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19661243>.

JORDAO, L. et al. On the killing of mycobacteria by macrophages. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 529-48, Feb 2008. ISSN 1462-5822 (Electronic)

1462-5814 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17986264>.

KASIK, J. E.; PEACHAM, L. Properties of beta-lactamases produced by three species of mycobacteria. **Biochem J**, v. 107, n. 5, p. 675-682, May 1968. ISSN 1470-8728 (Electronic).

Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16742589>.

KAUFMANN S H E; GENGENBACHER M. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. **FEMS Microbiol Rev**, V. 36. p. 514–532. 2012.

KIRATISIN, P.; APISARNTHANARAK, A.; KAEWDAENG, S. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, n. 3, p. 243-6, Sep 2010. ISSN 1872-7913 (Electronic)

0924-8579 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20541913>.

KOUL, A. et al. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 3, p. 189-202, Mar 2004. ISSN 1740-1526 (Print)

1740-1526 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15083155>.

KUSONOKI S, EZAKI T. Proposal of *Mycobacterium pergrinum* 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**. V. 42, p. 240-5. 1992.

KWON, H. H.; TOMIOKA, H.; SAITO, H. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. **Tuber Lung Dis**, v. 76, n. 2, p. 141-8, Apr 1995. ISSN 0962-8479 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7780097 >.

LAPPIN-SCOTT HM, COSTERTON JW. Bacterial biofilms and surface fouling. **Biofouling**. v. 1: p. 323-42. 1989.

LE DANTEC, C. et al. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 11, p. 5318-25, Nov 2002. ISSN 0099-2240 (Print)
 0099-2240 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12406720 >.

LEVY-FREBAULT, V. V.; PORTAELS, F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. **Int J Syst Bacteriol**, v. 42, n. 2, p. 315-23, Apr 1992. ISSN 0020-7713 (Print) 0020-7713 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1581193 >.

LIU, P. T.; MODLIN, R. L. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 4, p. 371-6, Aug 2008. ISSN 0952-7915 (Print)
 0952-7915 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18602003 >.

LOHMANN-MATTHES, M. L.; STEINMULLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **Eur Respir J**, v. 7, n. 9, p. 1678-89, Sep 1994. ISSN 0903-1936 (Print)
 0903-1936 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7995399 >.

LORIAN, V. Antibiotics in Laboratory Medicine. 1ªed. Williams & Wilkins, London 1980.

LYU, J. et al. Outcomes in patients with *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease treated with long-term injectable drugs. **Respir Med**, v. 105, n. 5, p. 781-7, May 2011. ISSN 1532-3064 (Electronic)
 0954-6111 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21211956 >.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 34-9, Jan 2001. ISSN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11166241 >.

MARTIN-DE-HIJAS, N. Z. et al. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 10, p. 931-6, Oct 2009. ISSN 1469-0691 (Electronic) 1198-743X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19624503 >.

MARTINEZ, S.; MCADAMS, H. P.; BATCHU, C. S. The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. **AJR Am J Roentgenol**, v. 189, n. 1, p. 177-86, Jul 2007. ISSN 1546-3141 (Electronic) 0361-803X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17579169 >.

MARTINS, M. C. Estudo Crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *Mycobacterium tuberculosis* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2000.

MATIN, A.; KHAN, Z.; ZAIDI, S. M. J.; BOYCE, M. C. Biofouling in reverse osmosis membranes for seawater desalination: Phenomena and prevention. **Desalination**, v. 281, p.1-16, 2011.

MATOS, E. D. et al. Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference center in Bahia: clinical epidemiological aspects. **Braz J Infect Dis**, v. 8, n. 4, p. 296-304, Aug 2004. ISSN 1413-8670 (Print) 1413-8670 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15565260 >.

MAZUMDAR K; DASTIDAR S G; PARK J H; DUTTA N K. The anti-inflammatory non-antibiotic heper compound diclofenac: an antibacterial drug target. **European Journal of Clinical Microbiology**. V. 28 (8). p 881-91. 2009.

MEIER, A. et al. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 11, p. 2452-4, Nov 1996. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8913445 >.

MIYASAKA, T. et al. In vitro efficacy of imipenem in combination with six antimicrobial agents against *Mycobacterium abscessus*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 3, p. 255-8, Sep 2007. ISSN 0924-8579 (Print) 0924-8579 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17616451>.

MOODY, J. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In: EISENBERG, H. D. (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 2nd. Washington D.C.: American Society for Microbiology, v.1, 2007. cap. 5, p.5.12.1-5.12.23.

MOSKOWITZ, S. M. et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 1915-22, May 2004. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15131149>.

MUKHOPADHYAY, S.; CHAKRABARTI, P. Altered permeability and beta-lactam resistance in a mutant of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 8, p. 1721-4, Aug 1997. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9257748>.

NASH, K. A.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J., 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**, v. 53, n. 4, p. 1367-76, Apr 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19171799>.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 8841-8, Aug 1 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10922044>.

NOSKIN G, A. Tigecycline: A New Glycylcycline for Treatment of Serious Infections. **Clinical Infectious Diseases**. V. 41, p. 303–14, 2005.

OBERLEY-DEEGAN, R. E. et al. The antioxidant mimetic, MnTE-2-PyP, reduces intracellular growth of *Mycobacterium abscessus*. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 41, n. 2, p. 170-8, Aug 2009. ISSN 1535-4989 (Electronic).
Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19097985 >.

PARK, S. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea. **J Korean Med Sci**, v. 23, n. 1, p. 49-52, Feb 2008. ISSN 1011-8934 (Print)
1011-8934 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18303198 >.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399-407, Jun 12 2008. ISSN 1934-6069 (Electronic)
1931-3128 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18541216 >.

PRIMM, T. P.; LUCERO, C. A.; FALKINHAM, J. O., 3RD. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 1, p. 98-106, Jan 2004. ISSN 0893-8512 (Print)
0893-8512 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14726457 >.

RASTOGI, N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. **Res. Microbiol.**, v. 142, p. 464-76, 2001.

RUNYON, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Med Clin North Am**, v. 43, n. 1, p. 273-90, Jan 1959. ISSN 0025-7125 (Print)
0025-7125 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13612432 >.

SAMPAIO, J. L. "Prokaryotic taxonomy rules and nomenclature changes in the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group." **Future Microbiol** 5: 1457; autor reply 1459. 2010

SANO C, SHIMIZU T, SATO K, KAWAUCHI H, KAWAHARA S, TOMIOKA H. Therapeutic effects of benzoxazinorifamycin KRM-1648 administered alone or in combination with a half-sized secretory leukocyte protease inhibitor or the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium against *Mycobacterium avium* complex infection in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 360-364. 1999

SANDER, P. et al. Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 5, p. 1295-304, Dec 2002. ISSN 0950-382X (Print)
0950-382X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12453216 >.

SENNA, S. G.; MARSICO, A. G.; SUFFYS, P. N.; FONSECA, L. S. Identificação e análise de MNTs causadoras de infecções no Hospital Universitário - HUCFF/UFRJ no Rio de Janeiro. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, p. S135-S62, 2006.

SHRIVASTAVA, S. M.; SHUKLA, S. K.; CHAUDHARY, M. Comparison of antimicrobial efficacy of a fixed dose combination of ceftazidime + sulbactam with ceftazidime and sulbactam alone against five bacteria. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 54, n. 5, p. 391-4, Sep 2009. ISSN 1874-9356 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19937210 >.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHAIBLE, U. E.; RUSSELL, D. G. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. **EMBO J**, v. 15, n. 24, p. 6960-8, Dec 16 1996. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9003772 >.

SWANSON D. J, C. D.; SMITH, I. L.; SCHENTAG, J. J. Degradation Kinetics of Imipenem in Normal Saline and in Human Serum. **Antimicrobial Agents Chemother.**, p. 936-37, 1986.

TSUKAMURA, M. Identification of mycobacteria. Obu, Aichi: The National Chubu Hospital; 1984.

TULKENS, P. M. Intracellular distribution and activity of antibiotics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 10, n. 2, p. 100-6, Feb 1991. ISSN 0934-9723 (Print)
0934-9723 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1864271 >.

UEKI, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; TELLES, M. A. S.; VIRGILIO, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no Estado de São Paulo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, p. 1-8, 2005.

VERGNE, I. et al. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, p. 367-94, 2004. ISSN 1081-0706 (Print)
1081-0706 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15473845 >.

WALLACE, R. J., JR. et al. Isoelectric focusing of beta-lactamases in *Mycobacterium fortuitum*. Association of a single enzyme pattern with cefoxitin resistance. **Am Rev Respir Dis**, v. 132, n. 5, p. 1093-7, Nov 1985. ISSN 0003-0805 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3877482 >.

_____. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. **Rev Infect Dis**, v. 5, n. 4, p. 657-79, Jul-Aug 1983. ISSN 0162-0886 (Print) 0162-0886 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6353528 >.

WAYNE, L. G.; KUBICA, G. P. Genus *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1986. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins; v. 2, p. 1436-57, 1986.