UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas
Área de Microbiologia Clínica

“Susceptibilidade Antimicrobiana e Tipagem Molecular de *Mycobacterium fortuitum*
Isoladas de Amostras Clínicas de Origem Humana”

WESLEY SCHIAVO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello
Sampaio

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

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

Schiavo, Wesley
S329s Susceptibilidade antimicrobiana e tipagem molecular de
Mycobacterium fortuitum isoladas de amostras clínicas de origem
humana / Wesley Schiavo. -- São Paulo, 2012.
60p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Droga : Resistência em microorganismo : Microbiologia
médica 2. Genoma : Biologia molecular 3. Mycobacterium :
Bacteriologia I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello, orientador.

616.01 CDD

Wesley Schiavo

“Susceptibilidade Antimicrobiana e Tipagem Molecular de *Mycobacterium fortuitum* Isoladas de Amostras Clínicas de Origem Humana”

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de ____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Valdir Schiavo e Eliana Valeria da Silva Schiavo, os responsáveis por tudo o que sou hoje. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Grupo Fleury por disponibilizar os isolados, prover equipamentos e software para a execução dos experimentos de eletroforese em campo pulsado.

À FAPESP pelo fomento concedido ao projeto sob número 2010/807-3.

À minha esposa Caroline de Camargo Schiavo por todo o apoio.

Aos meus grandes amigos Juliana Coutinho Campos e Artemir Coelho de Brito. A ajuda de vocês será para sempre lembrada com imenso carinho.

Ao meu orientador Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio por todo tempo e ensinamentos disponibilizados.

À minha irmã Suelen Schiavo por toda a torcida durante o projeto.

Ao laboratório de Microbiologia Clínica por toda estrutura cedida e à FCF-USP.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
1.1	Taxonomia e importância clínica	10
1.2	Epidemiologia das infecções por <i>Mycobacterium fortuitum</i>	12
1.3	Resistência antimicrobiana e seus determinantes genéticos em micobactérias de crescimento rápido	14
1.3.1	Resistência aos betalactâmicos	15
1.3.2	Resistência aos macrolídeos	17
1.3.3	Resistência às fluorquinolonas	17
1.3.4	Resistência às oxazolidinonas	18
1.3.5	Resistência a tetraciclina e glicilciclina	18
1.3.6	Resistência aos aminoglicosídeos	19
1.4	Metodologias utilizadas nos testes de sensibilidade	19
1.5	Motivação	20
2	OBJETIVO	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Isolados Bacterianos	22
3.2	Cultivo de isolados em meio sólido	22
3.3	Extração de DNA por lise térmica	22
3.4	Amplificação para sequenciamento parcial do gene <i>rpoB</i>	23
3.5	Eletroforese em Campos Alternados	23
3.6	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos por microdiluição	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Características da amostragem utilizada neste estudo	28
4.2	Sequenciamento parcial do gene <i>rpoB</i>	30
4.3	Análise da clonalidade	33
4.4	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	35
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÕES	42
	Referências Bibliográficas	43

RESUMO ESTRUTURADO EM PORTUGUÊS

SCHIAVO, W. **Susceptibilidade antimicrobiana e tipagem molecular de *Mycobacterium fortuitum* isoladas de amostras clínicas de origem humana.** 2012. 60 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Introdução: A revisão da literatura disponível no PubMed evidencia que há relatos de surtos de infecções por micobactérias de crescimento rápido ocorridos no Brasil, mas não há dados nacionais que permitam orientar o tratamento empírico até que o perfil de sensibilidade e a identificação da espécie estejam disponíveis. Não há estudo nacional com amostragem significativa de *M. fortuitum* nem tampouco análise da relação clonal entre isolados de vários pontos do território nacional. Este trabalho pretende trazer contribuições quanto ao entendimento da disseminação de clones de *M. fortuitum* no Brasil, assim como o perfil de sensibilidade dessa espécie no Brasil. **Material e métodos:** Foram utilizadas no estudo 121 isolados pertencentes ao banco de micobactérias do Fleury Medicina e Saúde, referentes ao período de janeiro de 2001 a dezembro de 2010. A identificação da espécie foi determinada por sequenciamento parcial do gene *rpoB*, a clonalidade foi avaliada por eletroforese em campos alternados e a susceptibilidade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se placas de microdiluição RAPMYCOI. **Resultados e conclusões:** Foram detectados três grupos clonais, sendo dois presentes na cidade de Campinas e o terceiro na cidade de Florianópolis. Foi observada a persistência do grupo clonal MFBRA2 na cidade de Campinas por seis anos. A maioria dos casos isolados em diferentes estados brasileiros pertence a grupos clonais distintos. O índice de similaridade de Dice mínimo para a identificação de um grupo clonal de *M. fortuitum* ao analisar fragmentos de restrição gerados por XbaI deve ser de 98%. Todos os isolados testados foram sensíveis à amicacina, tigeciclina, imipenem, ciprofloxacina, moxifloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim e linezolida, o que permite seu uso no tratamento empírico das infecções por *M. fortuitum*. Houve uma baixa taxa de sensibilidade à doxiciclina o que não subsidia seu uso em tratamento empírico. A taxa de sensibilidade de 89% para claritromicina não permite seu uso empírico no tratamento das infecções por *M. fortuitum*.

RESUMO ESTRUTURADO EM INGLÊS

SCHIAVO, W. **Antimicrobial susceptibility and molecular typing of *Mycobacterium fortuitum* isolated from clinical specimens of human origin.** 2012. 60 f. Thesis (MA) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

Introduction: The literature available on PubMed shows that there are reports of outbreaks of infections caused by rapidly growing mycobacteria occurred in Brazil, but there is no national data to guide empiric treatment until the susceptibility profile and identification of the species are available. No national study of significant sample of *M. fortuitum* nor analysis of the clonal relationship between isolates from various parts of the country. This work aims to bring contributions to the understanding of the spread of clones of *M. fortuitum* in Brazil, as well as the susceptibility pattern of this species in Brazil. **Material and methods:** We studied 121 isolates belonging to the mycobacteria collection from Fleury Medicina e Saúde, collected during the period from January 2001 to December 2010. Species identification was determined by partial sequencing of the *rpoB* gene, clonality was assessed by pulsed field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility was assessed using microdilution plates RAPMYCOI. **Results and conclusions:** There were three clonal groups, with two present in the city of Campinas and the third in Florianópolis. We observed the persistence of the clonal group MFBRA2 in Campinas for six years. Most cases isolated in different Brazilian states belong to different clonal groups. Our data indicate that Dice's similarity index for identification of a *M. fortuitum* clonal group should be at least 98% when analyzing restriction fragments generated by XbaI. All isolates tested were susceptible to amikacin, tigecycline, imipenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid, and trimethoprim-sulfamethoxazole, which allows its use in the empirical treatment of infections caused by *M. fortuitum*. There was a low sensitivity to doxycycline which does not subsidize its use in empiric treatment. The rate of 89% sensitivity does not allow the empirical use of clarithromycin in the treatment of infections caused by *M. fortuitum*.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é constituído de bacilos aeróbios ou microaerófilos, imóveis, não esporulados, não encapsulados, pleomórficos, podendo ser retos ou ligeiramente curvos, medindo 0,2 a 0,6 µm de largura e 1 a 10 µm de comprimento (Sneath, 1986). Possuem uma parede celular de estrutura incomum entre os procariotos, composta de quatro camadas. O peptideoglicano, que confere rigidez à parede e constitui a camada mais interna, é composto por ácido N-glicolilmurâmico, em vez de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria das bactérias. A camada seguinte é o arabinogalactano, fixada ao peptideoglicano por ligações fosfodiéster. Ácidos micólicos, ligados covalentemente ao arabinogalactano, representam cerca de 60% da parede celular micobacteriana. Esses ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono. A camada mais externa é composta de diferentes lipídios, incluindo os glicolipídios, sulfolipídios, fenolglicolipídios, peptidioglicolipídios e lipoarabinomananas. Em função do alto conteúdo lipídico de sua parede celular, as micobactérias resistem à descoloração com álcool-ácido. Apesar de não se corarem integralmente pelo método de Gram, são consideradas gram-positivas (Brennan e Besra, 1997; Alsteens, Verbelen *et al.*, 2008).

A complexidade da parede micobacteriana, e em particular a riqueza de lipídios complexos, conferem às micobactérias a capacidade de sobrevivência à exposição a agentes físicos e químicos, relativa impermeabilidade a agentes antimicrobianos e a capacidade de sobreviver em ambientes com baixos índices de umidade (Jarlier e Nikaido, 1994; Chatterjee, 1997; Rastogi, Legrand *et al.*, 2001; Cortesia, Lopez *et al.*, 2010).

A árvore filogenética das micobactérias pode ser dividida em dois grandes grupos: micobactérias de crescimento rápido (MCR) e micobactérias de crescimento lento. As micobactérias de crescimento rápido formam colônias visíveis a olho nu em até sete dias, quando incubadas em meio sólido, enquanto as de crescimento lento o fazem após sete a 30 dias de incubação. A temperatura ideal de crescimento é variável de acordo com a espécie e oscila numa faixa de 25°C a 45°C. A maioria das espécies é capaz de crescer em meios simples contendo aminoácidos, glicerol e

sais minerais, mas algumas necessitam de suplementos, a exemplo de *Mycobacterium haemophilum*, que requer hemina, *M. bovis* que requer piruvato ou ainda *M. leprae* que não cresce fora de células eucarióticas viáveis (Vincent e Gutiérrez, 2007).

1.1 Taxonomia e importância clínica

O gênero *Mycobacterium* abrange atualmente 154 espécies e 13 subespécies (Euzéby, 2012). Algumas espécies de crescimento lento, em função da grande similaridade genética e do fato de causarem o mesmo espectro de doenças, são agrupadas em complexos, a exemplo do Complexo *M. tuberculosis*, que inclui *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* e *M. canettii* (Brosch, Gordon *et al.*, 2002). Princípio semelhante fundamenta a descrição do Grupo *M. chelonae-abscessus*, que abrange as espécies *M. abscessus*, *M. chelonae*, e *M. immunogenum*. O Grupo *M. fortuitum* compreende as espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense* e *M. bonickei*. O Grupo *M. smegmatis* inclui as espécies *M. smegmatis*, *M. goodii* e *M. wolinskyi*, (Brown-Elliott e Wallace, 2002; Euzéby, 2011).

A taxonomia do gênero *Mycobacterium*, particularmente das micobactérias de crescimento rápido, tem sofrido atualizações constantes. Esse processo é devido principalmente à aplicação do sequenciamento de múltiplos genes para a definição de novas espécies (Adekambi, Berger *et al.*, 2006). Para micobactérias de crescimento rápido diversos genes podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto quando necessário, a exemplo de *hsp65*, *dnaJ*, *recA* e *rpoB*. Dentre esses, uma região hipervariável de 723 pares de bases (bp) tem sido amplamente utilizada para a diferenciação das espécies de crescimento rápido (Adekambi, Stein *et al.*, 2006; Kazumi, Maeda *et al.*, 2006; Monego, Duarte *et al.*, 2011).

As MCR são amplamente encontradas no ambiente, o que torna virtualmente universal a exposição humana a esses microrganismos. As espécies do Grupo *M. chelonae-abscessus* são encontradas em água potável, biofilmes em tubulações de sistemas de distribuição de água potável, piscinas, esgoto, solo, e superfície de artigos hospitalares (Kubica, Beam *et al.*, 1963; Carson, Petersen *et al.*, 1978;

Carson, Bland *et al.*, 1988; Fischeder, Schulze-Robbecke *et al.*, 1991; Leoni, Legnani *et al.*, 1999; Kressel e Kidd, 2001; Le Dantec, Duguet *et al.*, 2002b; a; Meyers, Brown-Elliott *et al.*, 2002; Reali, Deriu *et al.*, 2004). A ubiquidade dessas espécies no ambiente, particularmente em água e ambientes úmidos, contribui para o fato de que as espécies *M. chelonae* e *M. abscessus*, e os membros do Grupo *M. fortuitum* sejam as espécies mais prevalentes em infecções oportunistas causadas por micobactérias de crescimento rápido e relacionadas à infusão de soluções aquosas, ou exposição de sítios estéreis a água contaminada com micobactérias (Villanueva, Calderon *et al.*, 1997; Wallace, Brown *et al.*, 1998; Meyers, Brown-Elliott *et al.*, 2002; Tiwari, Ray *et al.*, 2003).

As MCR causam infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), a exemplo de infecções do sítio cirúrgico ou infecções secundárias a injeções de soluções, quando há esterilização inadequada dos equipamentos ou insumos, ou quebra de barreiras de esterilidade durante procedimentos médicos ou cosmiátricos (Brown-Elliott e Wallace, 2002; Cortesia, Lopez *et al.*, 2010).

As MCR podem ser resistentes ao processo de cloração utilizado para tratamento de água de piscinas ou para consumo humano, podem ser resistentes ao glutaraldeído (Griffith, 1997; Le Dantec, Duguet *et al.*, 2002a; Cortesia, Lopez *et al.*, 2010; Sabagh, Souto Ada *et al.*, 2012) e a sua replicação ocorre mesmo em condições de escassez de nutrientes (Carson, Petersen *et al.*, 1978). Essas características, quando somadas a procedimentos inadequados de desinfecção ou esterilização, e procedimentos invasivos, médicos ou não, criam um cenário favorável à ocorrência de IRAS.

Um número crescente de casos e surtos de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido tem sido reportado no Brasil (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006; Sampaio, Junior *et al.*, 2006; Sampaio, Viana-Niero *et al.*, 2006; Cardoso, Martins De Sousa *et al.*, 2008; Viana-Niero, Lima *et al.*, 2008; Cortesia, Lopez *et al.*, 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reportou 2520 casos notificados no período de 1998 a 2009 (ANVISA, 2010). Os agentes mais prevalentes nesses surtos pertencem aos Grupos *Mycobacterium chelonae-abscessus* e *Mycobacterium fortuitum*, mas tratando-se de *M. fortuitum* as publicações nacionais são escassas.

1.2 Epidemiologia das infecções por *Mycobacterium fortuitum*

A espécie *M. fortuitum* foi descrita originalmente na cidade do Rio de Janeiro, tendo sido cultivada de material coletado de abscesso após injeção intramuscular de solução de vitaminas. Trata-se do primeiro relato de infecção humana por *M. fortuitum* (Da Costa Cruz, 1938). As infecções causadas por *M. fortuitum* são, em sua maioria, secundárias a traumas nos quais há quebra da barreira cutânea, infecções relacionadas a cateteres vasculares, mamoplastia de aumento e cirurgias cardíacas, mas assim como *M. abscessus*, pode causar infecção pulmonar em pacientes com bronquiectasias (Brown-Elliott e Wallace, 2002; Park, Suh *et al.*, 2008; Jun, Jeon *et al.*, 2009; Hetsroni, Rosenberg *et al.*, 2010; Callen e Kessler, 2011).

O primeiro relato de surto causado por *M. fortuitum* data de 1978 e descreve a ocorrência de duas infecções ortopédicas (Halpern e Nagel, 1978). O segundo surto descrito na literatura se refere a quatro casos de infecções em esternotomia em um serviço de cirurgia cardíaca dos Estados Unidos, em 1981. O cultivo de diversas amostras ambientais não evidenciou a fonte de contaminação (Hoffman, Fraser *et al.*, 1981). Em 1985 a investigação da fonte de colonização de pacientes apresentando cultura de escarro positiva para *M. fortuitum* evidenciou uma máquina de gelo como o reservatório dessa espécie em um hospital do estado da Virgínia, nos Estados Unidos (Laussucq, Baltch *et al.*, 1988).

Alguns surtos de infecção cirúrgica têm sido reportados desde então, e um dos mais recentes ocorreu no Brasil na cidade de Campinas, em pacientes submetidas a mamoplastia de aumento ou reparadora durante o período de fevereiro de 2003 a abril de 2004. As investigações molecular e epidemiológica evidenciaram que havia um clone predominante em um dos hospitais. Foi detectado o reuso de moldes e sistemas ópticos, respectivamente para avaliação do tamanho da prótese e sua fixação, mas não foi possível evidenciar a fonte de contaminação. (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006; Padoveze, Fortaleza *et al.*, 2007). A ocorrência de infecção por *M. fortuitum* em pacientes submetidas a mamoplastia de aumento não é um problema apenas do Brasil (Clegg, Foster *et al.*, 1983; Heistein, Mangino *et al.*, 2000; Lizaso, Garcia *et al.*, 2011). Recentemente foi descrito um caso de infecção mamária

sem que houvesse qualquer tipo de procedimento cirúrgico em uma mulher de 51 anos (Betal e Macneill, 2011b) .

Apesar de várias espécies distintas terem sido isoladas de casos de infecção pós-mamoplastia de aumento, *M. fortuitum* é a espécie mais prevalente. Este fato reforça a importância do isolamento em cultura, correta identificação da espécie e realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos, pois fluorquinolonas, doxiciclina e sulfametoxazol-trimetoprim, em função da facilidade de administração por via oral, podem ser parte do esquema terapêutico para tratamento das infecções causadas por esta espécie, mas não tem atividade significativa contra as espécies do Grupo *M. chelonae-abscessus*.

M. fortuitum têm sido isolados de diferentes materiais clínicos e sua disseminação no ambiente é um dos principais fatores que contribuem para infecções causadas por este microrganismo. Em uma clínica especializada em cuidados de pacientes HIV positivos foram contaminados 47 pacientes e após investigação foi comprovado que os isolados pertenciam a um mês o grupo clonal, e que a fonte de contaminação era uma máquina de gelo (Gebo, Srinivasan *et al.*, 2002). Caso semelhante aconteceu envolvendo outras duas máquinas de gelo em hospital americano (Labombardi, O'brien A *et al.*, 2002).

Como originalmente descrito (Da Costa Cruz, 1938), infecções por *M. fortuitum* também podem ocorrer secundariamente ao uso de soluções injetáveis (Devi, Indumathi *et al.*, 2003; Kumar, Joseph *et al.*, 2011). Surto tem ocorrido também em procedimentos não médicos, a exemplo de um surto de infecções em mais de 100 clientes de um salão de beleza. Todas as pacientes haviam sido submetidas a hidromassagem dos membros inferiores após procedimentos de pedicure e ou depilação. (Snizek, Graham *et al.*, 2003). Surto envolvendo serviços cosmiatricos não são raros e causam grande preocupação (Winthrop, Albridge *et al.*, 2004; Vugia, Jang *et al.*, 2005).

Caracterizando a diversidade de locais de infecções existem relatos de infecções associadas a próteses (Cornelius, Reddix *et al.*, 2007; Porat e Austin, 2008; Bosio, Leekha *et al.*, 2011), infecções renais mesmo em paciente imunocompetente (Serra, Loi *et al.*, 2007), infecção após inserção de piercing no mamilo (Bengualid, Singh *et al.*, 2008), após acupuntura (Guevara-Patino, Sandoval

De Mora *et al.*, 2010), após mesoterapia (Nagore, Ramos *et al.*, 2001; Quinones, Ramalle-Gomara *et al.*, 2010), infecção nasal (Nguyen, Righini *et al.*, 2011), após a realização de *lifting* facial (Angeli, Lacour *et al.*, 2004).

Até mesmo em procedimentos onde é raro o envolvimento de micobactérias de crescimento rápido as infecções por *M. fortuitum* devem ser consideradas quando existe falha na antibioticoterapia (Fabbian, De Giorgi *et al.*, 2011; Renaud, Subramanian *et al.*, 2011).

1.3 Resistência antimicrobiana e seus determinantes genéticos em micobactérias de crescimento rápido

A classificação das MCR em grupos está estreitamente relacionada ao seu perfil de sensibilidade. As espécies do Grupo *M. fortuitum* são usualmente sensíveis a: amicacina, imipenem, doxiciclina, tigeciclina, ciprofloxacino, claritromicina, linezolida e sulfametoaxol (Gevaudan, Mallet *et al.*, 1988; Nagore, Ramos *et al.*, 2001; Ruiz-Aragon, Garcia-Agudo *et al.*, 2007; Regnier, Martinez *et al.*, 2008; Reddy, Garg *et al.*, 2010; Santos, Cremades *et al.*, 2010), mas podem apresentar resistência induzível à claritromicina, pela presença de RNA metilases (Nash, Zhang *et al.*, 2005).

Alguns autores têm avaliado a sensibilidade aos antimicrobianos em MCR em diferentes partes do mundo, mas muitos deles estão limitados a isolados com relação clonal e os resultados são baseados em um numero pequeno de isolados clínicos, principalmente os estudos nacionais (Hu, Chang *et al.*, 1997; Vemulapalli, Cantey *et al.*, 2001; Sungkanuparph, Sathapatayavongs *et al.*, 2003; Yang, Hsueh *et al.*, 2003; Hofling-Lima, De Freitas *et al.*, 2005; Santos, Cremades *et al.*, 2010).

As MCR são patógenos tipicamente intracelulares, mas são em sua maioria absoluta resistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento da tuberculose (Hernandez Garcia, Arias *et al.*, 1995; Shih, Hsueh *et al.*, 1997; Brown-Elliott e Wallace, 2002; Udou, 2006). É por esta razão que a identificação das micobactérias de crescimento rápido, assim como a sensibilidade frente a diferentes

antimicrobianos torna-se essencial no tratamento destas infecções (Ruiz-Aragon, Garcia-Agudo *et al.*, 2007). Além dessa resistência intrínseca aos fármacos utilizadas no tratamento da tuberculose, pode haver resistência ao número limitado de antimicrobianos que atingem concentração intracelular adequada em fagossomos, como as fluorquinolonas, macrolídeos e aminoglicosídeos (Tulkens, 1991). Não há consenso quanto ao tratamento ideal para essas infecções em função da inexistência de estudos clínicos randomizados. As diretrizes da American Thoracic Society (Griffith, Aksamit *et al.*, 2007), assim como aquela publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2009), baseiam-se em relatos de casos e experiências pessoais. A duração mínima do tratamento é de seis meses, e quando não há ressecção cirúrgica pode haver recidiva. O tratamento de infecções causadas pelo Grupo *M. fortuitum* costuma ser relativamente mais simples pelo perfil de sensibilidade apresentado por este grupo e alguns autores demonstram sucesso terapêutico utilizando-se amicacina, ciprofloxacina ou levofloxacina (Ruiz-Aragon, Garcia-Agudo *et al.*, 2007; Garcia-Agudo, Garcia-Martos *et al.*, 2009). Outras publicações têm demonstrado a excelente atividade *in vitro* da moxifloxacina, linezolida e tigeciclina contra MCR, mas não há estudos clínicos randomizados utilizando esses antimicrobianos, e sim apenas relatos de casos. (Wallace, Brown-Elliott *et al.*, 2001; Brown-Elliott, Wallace *et al.*, 2002; Wallace, Brown-Elliott *et al.*, 2002; Shen, Wu *et al.*, 2007; Garcia-Agudo, Garcia-Martos *et al.*, 2009). Em um estudo recente algumas combinações de drogas foram testadas. As combinações gatifloxacina associada a rifampicina ou rifabutina, moxifloxacina associada a rifampicina ou amicacina e ciprofloxacina associada a amicacina foram as mais efetivas contra *M. fortuitum* (Santos, Cremades *et al.*, 2010).

1.3.1 Resistência aos betalactâmicos

A resistência a alguns betalactâmicos é provavelmente devida a um somatório de eventos: baixa permeabilidade da parede, expressão de PBPs com baixa afinidade aos betalactâmicos e produção de betalactamases (Jarlier, Gutmann *et al.*, 1991; Fattorini, Orefici *et al.*, 1992; Mukhopadhyay e Chakrabarti, 1997; Brown-Elliott, Nash *et al.*, 2012).

Imipenem e cefoxitina são utilizados no esquema inicial de tratamento das infecções causadas por MCR, mas as concentrações inibitórias mínimas *in vitro* são relativamente elevadas e os betalactâmicos não apresentam maior concentração intracelular do que extracelular (Tulkens, 1991). Alguns autores demonstraram a potenciação da atividade *in vitro* de betalactâmicos contra micobactérias quando da associação com tazobactam (Kwon, Tomioka *et al.*, 1995). Apesar do sucesso na utilização de betalactâmicos, a presença de betalactamases já foi demonstrada em *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* e *M. tuberculosis*, mas os determinantes genéticos foram caracterizados apenas em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* (Kasik e Peacham, 1968; Wallace, Nash *et al.*, 1985; Flores, Parsons *et al.*, 2005). Os betalactâmicos entram na micobactéria pela porina MspA ou seus ortólogos; portanto a redução ou ausência de expressão pode levar à resistência a essa classe de antimicrobianos. Podem ocorrer mutações que levam à perda da expressão, diminuindo a penetração do antimicrobiano na célula bacteriana (Danilchanka, Pavlenok *et al.*, 2008); entretanto a não expressão de porinas tem um grande impacto reduzindo entrada de nutrientes, o que pode ser um custo metabólico por demais elevado para a sobrevivência da célula bacteriana (Stephan, Bender *et al.*, 2005). Considerando esse aspecto, é mais provável que a sensibilidade reduzida intrínseca aos betalactâmicos, observada em micobactérias não tenha como mecanismo principal a perda de porinas (Brown-Elliott, Mann *et al.*, 2012). Além da relativa impermeabilidade da parede celular, as transpeptidases – proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) podem contribuir para a resistência aos betalactâmicos em MCR. Algumas PBPs já foram caracterizadas em *M. smegmatis* (Basu, Chattopadhyay *et al.*, 1992; Mukherjee, Basu *et al.*, 1996; Mukhopadhyay e Chakrabarti, 1997). O genoma da cepa padrão de *M. abscessus* ATCC 19977 contém cinco genes que codificam PBPs, e é provável que outras espécies de MCR contenham esses genes (Ripoll, Pasek *et al.*, 2009). Considerando que a parede celular é um fator limitante tanto em *M. fortuitum* quanto em *M. abscessus*, é plausível supor que betalactamases ou PBPs possam ter um papel significativo no fato de que *M. abscessus* apresenta CIMs mais elevadas para imipenem do que *M. fortuitum* (Brown-Elliott e Wallace, 2002). Um outro mecanismo que pode explicar as CIMs mais elevadas para betalactâmicos no Grupo *M. abscessus* é a expressão de D,D-transpeptidases em lugar das PBPs clássicas (D,L-transpetidades) (Lavollay, Fourgeaud *et al.*, 2011).

1.3.2 Resistência aos macrolídeos

No que se refere aos macrolídeos, recentemente foi demonstrada a presença de RNA-metilases indutíveis, o que pode tornar ineficaz o uso dessa classe quando do tratamento de infecções causadas por *M. abscessus*. Some-se a isto o fato de que a incubação por 72 horas, tempo usual para leitura dos testes de susceptibilidade de MCR, não permite a detecção deste mecanismo de resistência (Nash, Brown-Elliott *et al.*, 2009). Quando este mecanismo está presente e o microrganismo é exposto ao macrolídeo, a expressão do mRNA da metilase aumenta de 23 a 250 vezes, o que pode explicar a ocorrência de falha terapêutica a despeito da sensibilidade *in vitro* nos teste convencionais (Nash, Brown-Elliott *et al.*, 2009). A presença de RNA-metilases é também a explicação mais provável para a ocorrência de “trailing” no teste de susceptibilidade a claritromicina, frequentemente observado em *M. fortuitum*, mas o significado clínico desse achado ainda é desconhecido (Nash, Zhang *et al.*, 2005; Esteban, Martin-De-Hijas, Garcia-Almeida *et al.*, 2009). Recentemente foi demonstrado o papel dos sistemas de efluxo na resistência a macrolídeos em *M. avium*; esses autores utilizaram inibidores de efluxo como verapamil, clorpromazina e tioridazina. A ocorrência desse mecanismo de resistência não foi demonstrada em MCR (Rodrigues, Sampaio *et al.*, 2009).

1.3.3 Resistência às fluorquinolonas

O alvo rimário das fluorquinolonas é a DNA girase, essencial para o relaxamento do DNA superespiralizado. A topoisomerase IV é também um alvo em outras bactérias, mas não há ortólogos cuja função tenha sido comprovada em micobactérias; portanto as evidências atuais indicam que a resistência a fluorquinolonas em micobactérias está primariamente ligada à ocorrência de mutações na subunidade A da girase – gene *gyrA* (Guillemin, Cambau *et al.*, 1995). Da mesma forma que nas demais bactérias, há uma região determinante da resistência às quinolonas localizada na porção 5’ do gene. Outros mecanismos de resistência às fluorquinolonas em MCR são efluxo (Liu, Takiff *et al.*, 1996; Bellinzoni,

Buroni *et al.*, 2009), acetilação ou nitrosilação (Adjei, Heinze *et al.*, 2007). Um estudo demonstrou também a capacidade de mutação do *M. fortuitum* quando exposto a concentrações subinibitórias de ciprofloxacina (Gillespie, Basu *et al.*, 2005). Há relatos de resistência a fluorquinolonas em MCR no Brasil, em clones de *M. chelonae*, *M. abscessus* e “*M. massiliense*”, mas não há estudo de amostragens não clonais, ou estudos evidenciando o determinante genético ou mecanismo da resistência (Hofling-Lima, De Freitas *et al.*, 2005; Duarte, Lourenco *et al.*, 2009).

1.3.4 Resistência às oxazolidinonas

As oxazolidinonas atuam na síntese proteica, ligando-se ao ribossomo bacteriano interferindo na entrada do t-RNA no sítio A (Ippolito, Kanyo *et al.*, 2008). A resistência às oxazolidinonas em MCR é usualmente mediada por mutação pontual no rRNA 23S (G2447T genoma de *Escherichia coli*), mas há outro mecanismo ainda não elucidado, provavelmente mediado por um transportador (Sander, Belova *et al.*, 2002).

1.3.5 Resistência a tetraciclina e glicilciclina

As ciclinas atuam impedindo a síntese proteica. Ligam-se à subunidade 30S do ribossomo interferindo na ligação do tRNA ao sítio A. As glicilciclina diferem em relação às demais ciclinas em função de sua maior afinidade pelo ribossomo bacteriano. A resistência a tetraciclina em *M. smegmatis* e *M. fortuitum* é usualmente mediada por sistema de efluxo e o operon tem localização plasmidial (De Rossi, Blokpoel *et al.*, 1998; Ramon-Garcia, Martin *et al.*, 2006), mas pode ocorrer também por proteção do ribossomo pelas proteínas TetM e outra (Rossi-Fedele, Scott *et al.*, 2006). A expressão do sistema de efluxo Tap pode elevar a CIM para tetraciclina em 8 a 16 vezes, mas em MCR a presença desse sistema não se correlaciona com a resistência à doxiciclina nem tigeciclina (Esteban, Martin-De-Hijas, Ortiz *et al.*, 2009).

1.3.6 Resistência aos aminoglicosídeos

Apesar de haver apenas um estudo sobre a ação dos aminoglicosídeos sobre as micobactérias, as observações são consistentes com o mecanismo de ação observado nas demais bactérias. A ligação dos aminoglicosídeos ao ribossomo pode provocar erros de leitura, inibir a translocação e impedir o acesso do tRNA ao sítio A (Wirmer e Westhof, 2006). Em cerca de 90% dos casos o mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos em micobactérias é a ocorrência de mutações nos genes rRNA 16S ou no gene que codifica a proteína S12 codificada pelo gene *rpsL* (Brown-Elliott, Nash *et al.*, 2012). Os demais mecanismos podem envolver a presença de plasmídeos, expressão de acetilases ou a reduzida permeabilidade da parede celular (Meier, Sander *et al.*, 1996). Segundo a literatura, a produção de acetilases não parece ser o mecanismo principal envolvido na resistência aos aminoglicosídeos (Ho, Chan *et al.*, 2000).

1.4 Metodologias utilizadas nos testes de sensibilidade

A metodologia considerada o padrão ouro para o teste de sensibilidade de micobactérias de crescimento rápido é a microdiluição em caldo, mas mesmo essa metodologia apresenta limitações. A mais importante é a instabilidade do imipenem quando incubado por 72 horas, não permitindo a avaliação adequada da sensibilidade das espécies do Grupo *M. chelonae-abscessus*, que respondem clinicamente, mas em sua maioria são intermediários *in vitro* por microdiluição (Clsi, 2011).

O gradiente de difusão em ágar – Etest – tem sido utilizado por alguns autores em função de sua praticidade, mas há boa correlação apenas para sulfonamida e doxiciclina, enquanto para os demais fármacos a moda obtida para cada um deles é uma ou duas diluições acima daquela obtida por microdiluição (Woods, Bergmann *et al.*, 2000), o que resulta em maior taxa de resistência.

O método de Kirby-Bauer não deve, a princípio, ser utilizado para fins de orientação terapêutica, mas pode ser útil na taxonomia ou como triagem e permite a diferenciação entre *M. fortuitum* e *M. abscessus*. Enquanto *M. fortuitum* é inibido *in vitro* pela polimixina B, *M. abscessus* não apresenta halo de inibição (Wallace, Swenson *et al.*, 1982).

1.5 Motivação

A revisão da literatura disponível no PubMed evidencia que há relatos de surtos de infecções por MCR ocorridos no Brasil, mas não há dados nacionais que permitam orientar o tratamento empírico até que o perfil de sensibilidade e a identificação da espécie estejam disponíveis. Não há estudo nacional com amostragem significativa de *M. fortuitum* nem tampouco análise da relação clonal entre isolados de vários pontos do território nacional. Este trabalho pretende trazer contribuições quanto ao entendimento da disseminação de clones de *M. fortuitum* no Brasil, assim como o perfil de sensibilidade dessa espécie no Brasil.

2 OBJETIVO

Caracterizar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e relação clonal de *M. fortuitum* isoladas de diferentes localidades brasileiras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos

Foram utilizadas no estudo isolados pertencentes ao banco de micobactérias do Fleury Medicina e Saúde, referentes ao período de janeiro de 2001 a dezembro de 2010. Após análise dos isolados do banco de cepas que estavam armazenados a -70°C foram excluídas amostras repetidas e contaminadas podendo ser recuperados 121 isolados viáveis para análise que estavam previamente identificados por PRA-*hsp65* como *M. fortuitum*.

3.2 Cultivo de isolados em meio sólido

Os isolados foram descongelados e imediatamente repicados em ágar sangue de carneiro a 5%, e as culturas foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 3 a 7 dias, em ar ambiente.

3.3 Extração de DNA por lise térmica

Os lisados foram preparados a partir de crescimento bacteriano obtido em ágar sangue, após 5 dias de incubação a 30°C . As suspensões bacterianas foram preparadas em água destilada estéril, de modo a atingir uma turbidez semelhante àquela equivalente à escala 3 de McFarland, fervidas por 10 minutos e a seguir congeladas a -70°C por um mínimo de 10 minutos. Quando necessário, os lisados foram descongelados à temperatura ambiente, homogeneizados e centrifugados a $12.000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para reações de amplificação.

3.4 Amplificação para sequenciamento parcial do gene *rpoB*

A composição da mistura de PCR (50µL) foi de 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgSO₄, 10% “enhancer” (Invitrogen), 200 µM de cada desoxinucleotídio trifosfato, 0,75 µM de cada oligonucleotídeo e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase Platinum® (Invitrogen). Uma região de 764bp do gene *rpoB* foi amplificada com os oligonucleotídeos MycoF 5′GCAAGGTCACCCCGAAGGG e MycoR 5′AGCGGCTGCTGGGTGATCATC. As condições de amplificação foram 95 °C por 1 min e a seguir 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30s, 64 °C por 30 s, 72 °C por 90 s e uma etapa única de 72 °C por 5 min. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para o sequenciamento dos amplicons (Adekambi, Berger *et al.*, 2006).

O sequenciamento de DNA foi realizado no Fleury Medicina e Saúde. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank, utilizando o programa BLAST - Basic Local Alignment Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.5 Eletroforese de Campos Alternados (PFGE)

Os isolados foram semeados em ágar sangue de carneiro a 5% e a seguir as culturas foram incubadas em ar ambiente a 37°C por cinco a sete dias. Em seguida foi transferido o equivalente a uma alça de 1µL para tubo contendo 3 mL de caldo MH com Tween 80 (MHT), antes da incubação a 37°C sob agitação a 140 rpm até que se obtivesse turvação equivalente a cerca de 0,64 de DO a 650nm. Em seguida foram transferidos 100 µL da suspensão para frasco estéril contendo 40 mL de caldo MHT, antes da incubação a 37°C sob agitação a 140 rpm por 36 a 48 horas até atingir DO de cerca de 0,5 a 650nm. Após agitação dos frascos, foram transferidos 2 mL para tubo de vidro onde foi verificada a DO em espectrofotômetro a 650nm, zerando o mesmo com caldo MHT estéril. O resultado foi transcrito para tabela em Excel. O cálculo foi feito considerando-se regra inversa direta. Para uma suspensão

bacteriana com DO de 0.3 foram utilizados 40 mL de MHT. Na prática dividimos 12 pela DO. O resultado obtido foi ainda dividido por 2 pois a metade do volume calculado é suficiente para preparação dos blocos.

Utilizando pipeta sorológica de 10 mL, foi transferido o volume de caldo MHT necessário para completar 15, 20, 30 ou 40 mL para cada tubo de 50 mL e o tubo foi centrifugado a 3000 a 3500 x g, 5°C, por 20 minutos. Em seguida o sobrenadante foi removido e a massa bacteriana foi congelada - 80 °C por uma hora. Durante esse intervalo foram preparados 200 mL de solução de STE (2mL Tris HCl 1M pH 8,0 + 20mL EDTA 0,5M pH 8,0 + 20 mL NaCl 1M , completando o volume para 200 mL com água ultra pura). Também foi preparada solução STE com 10mg/mL de lisozima, 0,1% Tween 80 para a confecção do bloco (Coleman e Spain, 2003). A agarose LMP a 2% em EDTA 125 mM foi preparada e dissolvida em microondas e finalmente estabilizada a 55°C.

Após uma hora de incubação a -80 °C os tubos permaceram em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos para o total descongelamento da massa (centrifugado) bacteriana. O volume do centrifugado foi aferido transferindo-o para um microtubo cônico de 1,5 mL utilizando-se uma pipeta automática ajustada em 50 µL. O volume foi anotado em planilha de Excel e foi completado o volume para 500 µL com a Solução de STE 0,1%Tween 80 (Coleman e Spain, 2003).

Foram preparados dois blocos para cada amostra utilizando-se o molde do sistema CHEF DR III. Os moldes foram colocados sobre gelo reciclável envolto em papel toalha e em seguida foram transferidos 82 µL da suspensão de micobactéria para um microtubo cônico vazio. A seguir a esse volume de suspensão foram adicionados 82 µL de agarose LMP, a mistura foi homogeneizada e utilizada para preenchimento do molde com cerca de 82 µL. Ao final do preparo de todos os blocos do lote o molde foi incubado a 5 °C por 10 minutos (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006)

Os blocos foram desenformados nos poços correspondentes de uma placa de cultura de células de fundo achatado contendo 10mg/mL de lisozima em STE. A placa foi tampada, embalada em filme de PVC e a seguir em folha de alumínio. A incubação ocorreu por 12 a 24 horas a 37°C sob leve agitação com 2mL de STE 10mg/mL lisozima em cada poço contendo dois blocos da mesma amostra (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006)

A placa foi retirada da estufa e a mesma foi incubada a 4°C por 1 hora. Durante a incubação ocorreu a preparação de 50 mL de solução de sarkosyl a 1% em EDTA 0,5M pH 8.0 (dissolvido a 55°C). A solução só foi utilizada após atingir a temperatura ambiente. Após uma hora, a solução de lisozima foi descartada e a cada poço foram adicionados 2mL de solução de sarkosyl a 1% em EDTA 0,5M pH 8.0 e foi realizada nova incubação de uma hora a 4°C. Nesse intervalo foi preparada solução de proteinase K (2mg/mL em sarkosyl 1%/EDTA 0,5 M). Para cada amostra foi utilizado 1 mL de solução de proteinase K (2mg/mL em sarkosyl 1%/EDTA 0.5M), (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006).

Após uma hora de incubação a solução de sarkosyl a 1% em EDTA 0,5M pH 8.0 foi descartada com auxílio de pipeta de Pasteur e nos poços foi adicionado 1 mL de solução de proteinase K (2mg/mL em sarkosyl 1%/EDTA 0.5M). A placa foi tampada e embalada em filme de PVC e a seguir em folha de alumínio. Ocorreu nova incubação a 55°C por 24 horas a 50 rpm em agitador orbital (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006).

Após 24 horas de incubação o conjunto foi incubado a 4°C por 1 hora. (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006). A solução de proteinase K foi descartada e os blocos foram lavados por 1 hora com solução TE 1X a 4°C, com 3 mL em cada poço da placa contendo os blocos. Neste intervalo em um microtubo de tampa rosqueada foi preparado solução de PMSF (10 mg em 250 µL de isopropanol incubado a 55°C até dissolução). Um volume de 50 mL de TE 1X foi aquecido a 55°C (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006). Após 1 hora a solução de TE 1X foi descartada e substituída por 2 mL de solução de TE 1X acrescida de 0,12mg/mL de PMSF a 55°C em cada poço. A placa foi tampada, embalada em filme de PVC e a seguir em folha de alumínio. A incubação da placa ocorreu por uma hora a 55°C sob leve agitação. Após 1 hora a placa ficou em repouso até atingir temperatura ambiente (em torno de 30 minutos), pois os blocos ficam amolecidos após incubação a 55°C (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006). Após atingir a temperatura ambiente, a solução foi desprezada e os blocos foram lavados por duas vezes com TE 1X em temperatura ambiente, cada lavagem de 45 minutos. Nesta etapa, ao final da lavagem com TE 1X, a solução pode ser descartada e os blocos podem ser imersos em EDTA 0,5M e armazenados a 4°C (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006).

Utilizando lâmina de bisturi nova e lâminas para microscopia novas, foi cortado um fragmento com cerca de 3 mm de cada bloco. Esses fragmentos foram lavados em 10 mL de TE 1X a 4°C por 2 vezes durante 30 minutos cada etapa. Em seguida a solução foi descartada e substituída por solução de Triton X100 a 0,1% em água por 2 horas a 4°C (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006). Nesse intervalo foi preparada solução de enzima XbaI FastDigest® conforme bula e foram transferidos 200 µL da solução para cada poço da placa de 96 poços com fundo em U estéril. O conjunto permaneceu sob refrigeração (2 a 8°C) por 30 minutos para estabilização e a digestão foi realizada por 15 minutos a 37°C.

Foram preparados 2L de tampão TBE 0,5X pH 8,3 para a corrida. O gel de agarose foi preparado na concentração de 1% em TBE 0,5X pH 8,3. Os blocos foram fixados no pente com a agarose a 1% em TBE 0,5X e em seguida foram acrescentados ao molde 100 mL de agarose a 1% em TBE 0,5X pH 8,3. Em todas as corridas a escala Lambda foi incluída como referência nas posições 1 e 15 do gel (New England Biolabs). A PFGE foi realizada com os seguintes parâmetros: 14°C, pulso inicial de 5 s, pulso final de 20 s, 6V/cm², ângulo de inclinação de 120° e 20 horas de corrida. Ao final da corrida o gel foi corado em solução de GelRed conforme as especificações do fabricante e fotografado em sistema eletrônico Alpha Innotech sob luz ultravioleta. A comparação dos perfis foi realizada utilizando-se o software Bionumerics.

3.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos por microdiluição

Para o teste de sensibilidade foram selecionados os 100 isolados mais recentes. Foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* no documento M24-A2 (Clsi, 2011). Foram testados amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolida, minociclina, moxifloxacino, tigeciclina, tobramicina, sulfametoxazol/trimetoprim, cefepima, ceftriaxona e amoxicilina/clavulanato, utilizando-se as placas RAPMYCOI da TREK Diagnostics®.

A partir de uma cultura pura com 72 horas de crescimento em ágar Mueller-Hinton uma porção de bactérias foi coletada com o auxílio de um swab umedecido em água deionizada estéril. A suspensão bacteriana foi preparada em um tubo contendo 4mL de água deionizada estéril e a turbidez foi ajustada para o padrão 0.5 da escala de McFarland, após sedimentação de grumos bacterianos, utilizando-se o equipamento Sensititre Nephelometer®.

Foram transferidos 50 µL dessa suspensão para 11 mL de caldo Mueller-Hinton suplementado com TES adquirido da Sensititre®. Com um pipetador multicanal todos os poços da placa foram preenchidos com 100 µl de suspensão diluída. A placa que continha todos os antimicrobianos liofilizados foi selada com adesivo plástico fornecido pelo fabricante das placas e a seguir as placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas em ar ambiente.

As leituras foram realizadas visualmente após 48 e 72 horas. Para fins de controle de qualidade foram utilizadas as cepas de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686 a cada batelada de testes. A placa com a cepa *S. aureus* ATCC 29213 foi incubada a 35 °C, ar ambiente e lida após 16 a 24 horas. A indicação do uso de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e não *M. peregrinum* ATCC 700686 é a inexistência de parâmetros para tigeciclina e definição imprecisa dos limites inferiores para amicacina, ciprofloxacino, claritromicina e sulfametoxazol.

4 RESULTADOS

4.1 Características da amostragem utilizada neste estudo

A maioria dos isolados (48,8%) foi cultivada de casos de infecções em pacientes do estado de São Paulo, 18,2% do Rio de Janeiro, 9,1% da Bahia e 7,4% de Goiás (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos isolados segundo Estado de origem.

ESTADOS	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
BAHIA	1	1	1	1		2		1	1	3	11
BRASILIA								1	2		3
CEARA					1				1		2
GOIAS			1	1	1	3		1	2		9
MATO GROSSO									1	1	2
PARA								2			2
PIAUI								1		1	2
RIO DE JANEIRO		2	1	2			2		8	7	22
RONDONIA				1							1
SANTA CATARINA					1	1		1	2	2	7
SÃO PAULO	1	3	4	8	6	4	6	10	8	9	59
TOCANTINS										1	1
Total	2	6	7	13	9	10	8	17	25	24	121

Cerca de 82% dos isolados foram cultivados de materiais obtidos de pacientes do sexo feminino (Tabela 2), o que é consistente com o tipo de amostra clínica original em 51,2% dos casos: secreção de mama (Tabela 3). Apesar da diversidade de amostras clínicas, cerca de 50% correspondem a amostras de infecções de sítio cirúrgico.

Tabela 2. Distribuição dos isolados segundo faixa etária e sexo.

Faixa Etária	Sexo		Total
	F	M	
ATÉ 30 ANOS	30	5	35
DE 31 A 40 ANOS	22	2	24
DE 41 A 50 ANOS	21	4	25
DE 51 A 60 ANOS	5	1	6
MAIS DE 60 ANOS	8	6	14
ND	13	4	17
Total	99	22	121

ND= Informação não disponível

Tabela 3. Distribuição dos isolados segundo o material clínico.

MATERIAL CLÍNICO	Total
ABSCESSO	1
ESCARRO	12
FERIDA CIRURGICA	2
FRAG MEMBRO INFERIOR	1
FRAGMENTO BRACO	1
GANGLIO	1
LAVBR	1
LESAO PE	1
ND	14
SANGUE	1
SECREÇÃO	1
SECREÇÃO ABDOMINAL	6
SECREÇÃO ABDOMINAL POS CIRURGICA	1
SECREÇÃO AXILA	1
SECREÇÃO FERIDA CIRURGICA	1
SECREÇÃO GLUTEO	3
SECREÇÃO JOELHO	1
SECREÇÃO MAMA	62
SECREÇÃO NADEGA	1
SECREÇÃO OSTIO GASTROSTOMIA	1
TECIDO ABDOMINAL	1
TECIDO COXA	1
TECIDO MAMA	2
URINA	4
Total	121

ND= Informação não disponível

Não é possível calcular a incidência de casos positivos para *M. fortuitum*, pois não temos o dado quanto à população geral exposta; entretanto, a partir de 2008 houve um aumento de pelo menos 70% em comparação com os demais anos, excluindo-se o ano de 2004 no qual ocorreu o surto em Campinas (Figura 1). É possível que a incidência de infecções por MCR esteja aumentando, assim como o número de cirurgias com fins estéticos no Brasil.

Figura 1. Distribuição dos isolados segundo ano de detecção.

4.2 Sequenciamento parcial do gene *rpoB*

Dentre os 121 isolados inicialmente selecionados, em 113 apresentaram sequências de *rpoB* com 99,0% ou mais de similaridade com a sequência da cepa padrão de *M. fortuitum* depositada no GenBank sob o registro AY147169.1 (Tabela 4). Os demais, por não pertencerem à espécie *M. fortuitum*, foram excluídos deste estudo.

Tabela 4. Isolados utilizados neste estudo.

BANCO	DATA	SEXO	IDADE	MATERIAL	ESTADO
2815	17/12/2010	F	43	SECREÇÃO AXILA	SÃO PAULO
2755	29/10/2010	F	48	FERIDA CIRURGICA	RIO DE JANEIRO
2715	06/10/2010	M	57	ABSCESSO	SANTA CATARINA
2717	17/09/2010	F	32	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
2720	15/09/2010	M	ND	ND	SÃO PAULO
2686	10/09/2010	F	30	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
2687	28/08/2010	M	34	SECREÇÃO ABDOMINAL	RIO DE JANEIRO
2680	17/08/2010	F	ND	SECREÇÃO GLUTEO	RIO DE JANEIRO
2639	27/07/2010	F	45	FRAGMENTO BRACO	BAHIA
2613	13/07/2010	F	28	ND	RIO DE JANEIRO
2614	08/07/2010	F	21	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
2605	30/06/2010	F	50	LESAO PE	SÃO PAULO
2602	22/05/2010	F	83	ESCARRO	SÃO PAULO
2527	23/04/2010	F	48	SECREÇÃO FERIDA CIRURGICA	BAHIA
2536	14/04/2010	F	55	SECREÇÃO MAMA	SANTA CATARINA
2477	01/04/2010	M	ND	SECREÇÃO MAMA	RIO DE JANEIRO
2491	20/03/2010	F	83	ESCARRO	RIO DE JANEIRO
2495	17/03/2010	F	41	TECIDO ABDOMINAL	BAHIA
2488	13/03/2010	F	55	SECREÇÃO JOELHO	SÃO PAULO
2471	08/03/2010	F	38	SECREÇÃO MAMA	PIAUI
2470	01/03/2010	F	36	SECREÇÃO MAMA	TOCANTINS
2577	12/02/2010	F	25	SECREÇÃO MAMA	RIO DE JANEIRO
2461	03/02/2010	F	41	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
2427	16/01/2010	F	29	ND	MATO GROSSO
2406	29/12/2009	F	32	SECREÇÃO MAMA	SANTA CATARINA
2405	29/12/2009	F	21	SECREÇÃO MAMA	SANTA CATARINA
2410	23/12/2009	F	29	SECREÇÃO GLUTEO	GOIAS
2425	15/12/2009	F	34	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
2363	26/11/2009	F	21	SECREÇÃO MAMA	GOIAS
2366	17/11/2009	M	24	SECREÇÃO NADEGA	SÃO PAULO
2371	29/10/2009	F	39	ND	CEARA
2308	15/09/2009	F	21	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
2315	11/08/2009	F	27	SECREÇÃO MAMA	MATO GROSSO
2258	30/07/2009	F	ND	SECREÇÃO MAMA	RIO DE JANEIRO
2239	04/07/2009	F	ND	ESCARRO	RIO DE JANEIRO
2228	05/06/2009	M	30	SECREÇÃO ABDOMINAL POS CIRURGICA	SÃO PAULO
2206	16/05/2009	F	ND	ND	RIO DE JANEIRO
2210	12/05/2009	M	27	TECIDO COXA	SÃO PAULO
2189	28/04/2009	M	28	SECREÇÃO ABDOMINAL	SÃO PAULO
2142	17/04/2009	F	ND	TECIDO MAMA	RIO DE JANEIRO
2171	15/04/2009	F	56	SECREÇÃO MAMA	RIO DE JANEIRO
2134	07/04/2009	M	42	SECREÇÃO ABDOMINAL	SÃO PAULO
2161	04/03/2009	F	ND	ND	RIO DE JANEIRO
2102	04/03/2009	M	63	ESCARRO	BAHIA
2083	31/01/2009	F	40	TECIDO MAMA	BRASILIA
2059	06/01/2009	F	47	SECREÇÃO MAMA	BRASILIA
2047	02/01/2009	F	18	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO

Continua...

BANCO	DATA	SEXO	IDADE	MATERIAL	ESTADO
1983	03/11/2008	F	32	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1980	27/10/2008	F	36	ND	SÃO PAULO
1981	22/10/2008	F	34	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1979	18/10/2008	F	46	ND	PIAUI
1984	11/10/2008	M	80	ND	GOIAS
1965	02/10/2008	F	ND	ND	PARA
1962	27/09/2008	F	46	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1975	08/09/2008	F	30	SECREÇÃO MAMA	PARA
1942	04/09/2008	F	21	SECREÇÃO MAMA	SANTA CATARINA
1933	30/07/2008	F	36	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1932	20/08/2008	F	30	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1560	29/05/2007	F	ND	SECREÇÃO OSTIO GASTROSTOMIA	RIO DE JANEIRO
1529	25/05/2007	F	25	SECREÇÃO MAMA	RIO DE JANEIRO
1533	03/05/2007	F	26	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1515	10/04/2007	F	48	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1493	14/03/2007	F	23	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1484	05/03/2007	F	26	SECREÇÃO GLUTEO	SÃO PAULO
1438	19/01/2007	F	29	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1454	08/01/2007	M	42	ESCARRO	SÃO PAULO
1427	22/12/2006	F	45	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1880	14/12/2006	F	67	FRAG MEMBRO INFERIOR	BAHIA
1415	27/10/2006	F	ND	SECREÇÃO MAMA	GOIAS
1381	22/09/2006	F	79	URINA	GOIAS
1369	25/08/2006	F	32	SECREÇÃO MAMA	GOIAS
1286	04/03/2006	F	28	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1279	22/02/2006	M	29	ESCARRO	SÃO PAULO
1275	15/02/2006	M	65	ND	SÃO PAULO
1257	03/02/2006	F	32	SECREÇÃO MAMA	SANTA CATARINA
1256	13/01/2006	F	79	ESCARRO	BAHIA
1192	08/11/2005	F	35	ND	GOIAS
1168	02/09/2005	F	33	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1139	27/07/2005	F	ND	URINA	SÃO PAULO
1136	05/07/2005	M	35	URINA	CEARA
1100	04/05/2005	F	29	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1089	20/04/2005	F	24	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1060	22/03/2005	F	22	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
1058	17/03/2005	F	45	URINA	SANTA CATARINA
1056	25/02/2005	F	51	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
955	24/09/2004	F	18	SECREÇÃO MAMA	RONDONIA
940	14/07/2004	F	34	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
934	23/06/2004	F	41	SECREÇÃO MAMA	RIO DE JANEIRO
925	28/05/2004	F	48	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
924	26/05/2004	F	70	SECREÇÃO MAMA	BAHIA
915	10/05/2004	F	35	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
913	04/05/2004	F	27	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
907	08/03/2004	F	42	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
903	31/03/2004	M	48	LAVBR	SÃO PAULO
887	23/03/2004	F	39	SECREÇÃO MAMA	GOIAS

Continua...

BANCO	DATA	SEXO	IDADE	MATERIAL	ESTADO
889	01/03/2004	F	41	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
857	30/01/2004	F	42	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
842	27/11/2003	F	27	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
839	24/11/2003	F	48	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
814	17/09/2003	F	23	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
801	26/09/2003	M	ND	SECREÇÃO	BAHIA
800	26/09/2003	F	36	SECREÇÃO MAMA	SÃO PAULO
692	08/01/2003	M	61	ND	RIO DE JANEIRO
675	04/12/2002	M	63	ESCARRO	RIO DE JANEIRO
641	25/09/2002	F	39	SECREÇÃO ABDOMINAL	SÃO PAULO
638	09/09/2002	F	35	SECREÇÃO ABDOMINAL	SÃO PAULO
617	06/07/2002	F	65	ESCARRO	RIO DE JANEIRO
562	14/05/2002	F	ND	SECREÇÃO MAMA	BAHIA
563	04/05/2002	F	29	SANGUE	SÃO PAULO
479	14/08/2001	F	ND	SECREÇÃO MAMA	BAHIA
455	23/03/2001	M	48	GANGLIO	SÃO PAULO

ND= Não Determinado por falta de informação

Nota: Os isolados 857 e 907 foram cultivados da mesma paciente em datas distintas.

4.3 Análise da clonalidade

O critério mais aceito para agrupar perfis gerados por PFGE é um índice de similaridade de Dice mínimo de 80%; entretanto caso utilizássemos este critério, isolados epidemiologicamente não relacionados – F00924 e F00868 (Figura 2 – notar seta verde) seriam agrupados em um mesmo grupo clonal. Utilizamos, portanto um índice de similaridade mínimo de 98% para caracterização de um mesmo grupo clonal. Utilizando esse critério, foi detectada a presença de dois grupos clonais na cidade de Campinas, designados MFBRA1 e MFBRA2. Ambos foram detectados em pacientes submetidas a mamoplastia. Digno de nota, grupo clonal MFBRA2 foi detectado pela primeira vez em 2004 e foi detectado novamente em 2008 e 2010, evidenciando seis anos de persistência no ambiente na cidade de Campinas (Figura 2). Um terceiro grupo clonal, designado MFBRA3 foi detectado em pacientes da cidade de Florianópolis em 2008 e 2009, da mesma forma que o observado em Campinas, sugerindo persistência no ambiente por um ano. Os perfis dos demais isolados apresentaram índices de similaridade com valores inferiores a 98% e foram considerados como pertencentes a diferentes grupos clonais.

Figura 2. Avaliação da clonalidade de *M. fortuitum* isolados em diferentes cidades brasileiras. Notar a persistência de um mesmo clone na cidade de Campinas, São Paulo (MFBR2) de 2004 a 2010. Dendograma gerado com o programa Bionumerics, com 1% de tolerância e otimização e índice de Dice. Notar dois perfis não relacionados epidemiologicamente (escarro e secreção de mama), mas índice de similaridade de 97% (seta verde).

4.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Em função da limitação do número de placas comerciais para microdiluição (Trek), foram testados apenas os 100 isolados mais recentes. Em 10 casos houve contaminação por outro microrganismo impedindo a leitura e não foi possível a repetição. As cepas de referência apresentaram resultados dentro dos limites aceitáveis. Os resultados foram compilados em tabela Excel e a seguir foram identificados os valores de CIM50 e CIM90 para cada antimicrobiano (Tabela 5). Esses valores correspondem respectivamente à menor CIM capaz de inibir 50% e 90% da amostragem analisada. Os resultados foram interpretados conforme o documento CLSI M24-A2 (Clsi, 2011). Dentre os fármacos de uso oral, houve 100% de sensibilidade para sulfametoxazol-trimetoprim, linezolida, ciprofloxacina e moxifloxacina. A claritromicina foi ativa em 89% dos casos, o que confirma a necessidade de associação de antimicrobianos no tratamento empírico das infecções por MCR. A doxiciclina foi ativa contra 35% dos isolados.

Quanto aos antimicrobianos de uso parenteral, a amicacina, o imipenem e a tigeciclina foram ativos contra 100% dos isolados, enquanto a cefoxitina foi ativa apenas contra 68% dos isolados e a tobramicina ativa em apenas 13% dos casos.

Tabela 5. Perfil de sensibilidade de *M. fortuitum* (n= 90).

Antimicrobiano	Faixa de CIM µg/mL	CIM50 µg/mL	CIM90 µg/mL	% Sensibilidade
Tobramicina	2 - 16	8	16	13%
Trimetoprim/Sulfametoxazol	<0.25/4.75 - 2/38	<0.25/4.75	<0.25/4.75	100%
Linezolida	<1 - 8	2	4	100%
Ciprofloxacina	<0.12 - 2	<0.12	0.25	100%
Imipenem	<2 - 4	<2	4	100%
Moxifloxacina	<0.25 - 1	<0.25	<0.25	100%
Cefepima	8 - >32	>32	>32	-
Cefoxitina	8 - 128	16	32	68%
Amoxicilina/Clavulanato	<2/1 - 64/32	8/4	16/8	-
Amicacina	<1	<1	<1	100%
Ceftriaxona	>64	>64	>64	-
Doxiciclina	<0.12 - >16	16	>16	35%
Minociclina	<1 - >8	8	>8	-
Tigeciclina	<0.015 - 0.12	<0.015	0.06	100%
Claritromicina	<0.06 - 8	1	4	89%

Nota: Devido a ausência de pontos de corte para cefepima, amoxicilina/clavulanato, ceftriaxona e minociclina a porcentagem de sensibilidade não foi calculada.

5 DISCUSSÃO

A espécie *M. fortuitum* foi isolada originalmente na cidade do Rio de Janeiro, de um paciente com abscesso após injeção intramuscular de solução de vitaminas (Da Costa Cruz, 1938). As infecções causadas por *M. fortuitum* são, em sua maioria, secundárias a traumas nos quais há quebra da barreira cutânea, infecções relacionadas a cateteres vasculares, mamoplastia de aumento e cirurgias cardíacas, e raramente infecção pulmonar em pacientes com bronquiectasias (Brown-Elliott e Wallace, 2002). Vários surtos de infecção cirúrgica têm sido reportados, e um dos mais recentes ocorreu na cidade de Campinas, em pacientes submetidas a mamoplastia de aumento (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006; Padoveze, Fortaleza *et al.*, 2007).

As características da amostragem utilizada neste trabalho são compatíveis com os achados do relatório descritivo de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido no Brasil (ANVISA, 2011) onde São Paulo (n=59; 46,2%) e Rio de Janeiro (n=22; 18,1%) foram as capitais que mais notificaram casos envolvendo infecções por *M. fortuitum*, evidenciando que existe uma concentração de casos no nosso país. Apesar de não haver dados precisos sobre a incidência, o número de casos de infecção por *M. fortuitum* com diagnóstico laboratorial vêm aumentando significativamente nos últimos anos; dos 121 isolados utilizados neste trabalho 54,5% (n=66) foram detectados no período de 2008 a 2010.

O aumento no número de casos de MCR como agentes de IRAS pode ser explicado por algumas hipóteses como: melhorias na capacidade diagnóstica laboratorial no país; aumento na sensibilidade de detecção e notificação dos casos pelos centros estaduais de vigilância epidemiológica; reprocessamento inadequado de dispositivos médicos; introdução e uso disseminado de novos procedimentos cosmiátricos (ANVISA, 2011).

Além da concentração dos casos, existe um determinado perfil que pode ser observado no envolvimento destas infecções, já que na maioria destes casos as infecções por MCR estão envolvendo mulheres na idade adulta (n=78; 64,4%). Este

dado fica facilmente entendido uma vez que 50,4% (n=61) das infecções por *M. fortuitum* ocorrem envolvendo procedimentos cirúrgicos nas mamas femininas, como por exemplo: mamoplastia de aumento.

Recentemente um caso bastante raro foi descrito na Inglaterra, envolvendo infecção mamária sem que houvesse qualquer tipo de procedimento cirúrgico ou cosmiátrico em uma mulher de 51 anos imunocompetente. O exame anatomopatológico evidenciou mastite granulomatosa e lobulite. Houve resposta adequada ao tratamento com doxiciclina e ciprofloxacina (Betal e Macneill, 2011a). O isolamento de *M. fortuitum* nesse contexto aponta a necessidade de avaliação da mama como potencial sítio de colonização, particularmente em função do fato de os canais principais da mama ser exteriorizados no mamilo e potencialmente funcionarem como porta de entrada para microrganismos. Se por um lado o aspecto policlonal das infecções nas demais cidades do Brasil torna improvável a origem das infecções em próteses contaminadas, por outro sustenta a hipótese de que a infecção cirúrgica possa ser secundária à manipulação cirúrgica de mamas previamente colonizadas por *M. fortuitum*.

Epidemiologicamente, é muito importante a investigação destes surtos de infecções por MCR e a ferramenta mais discriminativa para a genotipagem é a eletroforese em campos alternados, que vem sendo utilizado para genotipar diferentes espécies de bactérias incluindo o *M. fortuitum* (Hector, Pang et al., 1992; Winthrop, Abrams et al., 2002; Sampaio, Chimara et al., 2006). Neste trabalho optamos por utilizar um critério mais rígido para definição dos grupos clonais – 98% - em função da detecção de dois isolados com 97% de similaridade, mas sem relação epidemiológica. Esse critério difere daquele usualmente utilizado – 80% - nas demais análises de perfis gerados por PFGE; entretanto a epidemiologia deve ser considerada o padrão ouro.

As cirurgias plásticas são muito comuns no Brasil e seu número vêm aumentando a cada ano. Um dos procedimentos mais realizados no país é a mamoplastia de aumento (Datafolha, 2009). No Brasil esse quadro de infecções envolvendo procedimentos de mamoplastia de aumento é bastante preocupante uma vez que essas infecções estão caracterizadas pela presença de um clone predominante isolado em uma mesma cidade (Sampaio, Chimara et al., 2006). Em

2004 um caso de infecção pelo clone MFBR2 foi detectado, mas o mesmo não ocorreu nos anos de 2005, 2006 e 2007 (Sampaio, Chimara *et al.*, 2006). Em 2008 foram detectados três casos e todos eles na cidade de Campinas. Em 2010 o mesmo clone foi encontrado novamente em Campinas (Figura 2), indicando a persistência em uma fonte de infecção comum a todas as cirurgias. Essa fonte pode ser uma cânula cirúrgica, instrumentos de fibra óptica utilizados para fixação da prótese, medidores ou ainda a prótese utilizada (ANVISA, 2011), mas o que mais frequentemente é descrito na literatura é a contaminação do sistema de abastecimento de água, como recentemente evidenciado no Texas, na cidade de Galveston. A investigação do surto de infecções por *M. porcinum*, espécie pertencente ao Grupo *M. fortuitum*, e a análise de clonalidade por PFGE evidenciaram que 92% dos isolados recuperados de pacientes e fontes ambientais pertenciam ao mesmo grupo clonal (Brown-Elliott, Wallace *et al.*, 2011).

Levando-se em conta que as diferentes marcas de próteses mamárias são potencialmente distribuídas por todo o Brasil e o clone MFBRA2 apresenta porcentagem de similaridade baixa quando comparado aos isolados de outras cidades do Brasil, a predominância e persistência de um único clone na cidade de Campinas é mais compatível com contaminação de instrumental cirúrgico ou ambiental. O mesmo clone que designamos MFBRA2 persiste há 6 anos na cidade.

Na Figura 2 o retângulo verde indica isolados com similaridade superior a 97% na cidade de Florianópolis em Santa Catarina, também isolados de secreção mamária demonstrando que diferentes clones de *M. fortuitum* estão disseminados no território brasileiro. Esses dados não podem ser compreendidos como um fenômeno aceitável, uma vez que a grande maioria dessas IRAS potencialmente seriam preveníveis por meio de estratégias elementares de controle de infecções (ANVISA, 2011).

Levando-se em conta a distribuição dessas infecções no país é imprescindível que a susceptibilidade frente a antimicrobianos desses isolados seja conhecida já que para a antibioticoterapia não há consenso quanto ao tratamento ideal para essas infecções em função da inexistência de estudos clínicos randomizados. As diretrizes da American Thoracic Society (Griffith, Aksamit *et al.*, 2007), assim como aquela publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2009), baseiam-se em relatos de casos e experiências pessoais. A duração mínima do

tratamento é de seis meses, e quando não há ressecção cirúrgica pode haver recidiva.

Alguns autores têm avaliado a sensibilidade aos antimicrobianos em microbactérias de crescimento rápido em diferentes partes do mundo, mas esses estudos ainda são escassos porque muitos deles estão limitados a isolados com relação clonal e os resultados são baseados em um número pequeno de isolados clínicos, principalmente no território brasileiro (Hu, Chang *et al.*, 1997; Vemulapalli, Cantey *et al.*, 2001; Sungkanuparph, Sathapatayavongs *et al.*, 2003; Yang, Hsueh *et al.*, 2003; Hofling-Lima, De Freitas *et al.*, 2005; Santos, Cremades *et al.*, 2010).

Este trabalho se propôs a genotipar os isolados de *M. fortuitum* tanto para informação epidemiológica como para que fossem realizadas as concentrações inibitórias mínimas frente a diferentes antimicrobianos de cepas com e sem relação clonal objetivando uma amostragem mais diversificada e abrangente do comportamento destes isolados frente aos antimicrobianos.

O tratamento de infecções causadas pelo Grupo *M. fortuitum* costumam ser relativamente mais simples pelo perfil de sensibilidade usual. Alguns autores demonstram sucesso terapêutico utilizando-se amicacina, ciprofloxacina e levofloxacina (Ruiz-Aragon, Garcia-Agudo *et al.*, 2007; Garcia-Agudo, Garcia-Martos *et al.*, 2009), outras publicações têm demonstrado a excelente atividade “in vitro” das novas quinolonas, linezolida e tigeciclina contra as infecções por MCR.

Os perfis de sensibilidade obtidos com a amostragem analisada neste trabalho são compatíveis com aqueles disponíveis na literatura internacional. Quanto aos antimicrobianos de uso oral, as quinolonas fluoradas, sulfametoxazol-trimetoprim e linezolida apresentaram CIMs90 dentro da faixa de sensibilidade, o que permite seu uso empírico sem o teste de sensibilidade, desde que seja realizada a identificação correta da espécie. Nossos achados são similares àqueles disponíveis na literatura, mas não há dados nacionais sobre o assunto (Wallace, Brown-Elliott *et al.*, 2001; Brown-Elliott, Wallace *et al.*, 2002; Wallace, Brown-Elliott *et al.*, 2002; Shen, Wu *et al.*, 2007; Garcia-Agudo, Garcia-Martos *et al.*, 2009; Cavusoglu, Gurpinar *et al.*, 2012).

Conforme já descrito na literatura, a combinação amoxicilina/clavulanato foi ativa contra *M. fortuitum*, o que caracteriza a presença de betalactamases como um mecanismo relevante de resistência nessa espécie (Cynamon e Palmer, 1983;

Utrup, Moore *et al.*, 1995). A caracterização dessas betalactamases ultrapassa o escopo deste estudo.

A CIM90 para claritromicina foi de 4 µg/ml, valor considerado intermediário segundo os critérios interpretativos do documento M24-A2 (CIsi, 2011), o que não suporta seu uso empírico sem a realização de testes de sensibilidade (Brown, Wallace *et al.*, 1992; Fernandez-Roblas, Esteban *et al.*, 2000; Fernandez-Roblas, Martin-De-Hijas *et al.*, 2008; Cavusoglu, Gurpinar *et al.*, 2012). Já é bem conhecida a expressão de metilases indutíveis por essa espécie, que já desautorizava seu uso como monoterapia (Nash, Zhang *et al.*, 2005).

Para os fármacos injetáveis, que usualmente são utilizados nos quadros mais graves, como imipenem e amicacina, as CIMs90 também correspondem a valores considerados sensíveis segundo o documento M24-A2 do CLSI, o que confirma dados da literatura e suporta seu uso empírico no tratamento de paciente com infecções por *M. fortuitum* no Brasil (Brown-Elliott e Wallace, 2002; Shen, Wu *et al.*, 2007; Fernandez-Roblas, Martin-De-Hijas *et al.*, 2008; Gayathri, Therese *et al.*, 2010; Brown-Elliott, Mann *et al.*, 2012; Cavusoglu, Gurpinar *et al.*, 2012). Segundo a literatura, a produção de acetilases não parece ser o mecanismo principal envolvido na resistência aos aminoglicosídeos (Ho, Chan *et al.*, 2000); entretanto observamos em nossa amostragem uma elevada taxa de resistência à tobramicina e 100% de sensibilidade à amicacina. Esse perfil é compatível com a produção de acetilases AAC-3 ou AAC-6 (Shaw, Rather *et al.*, 1993). A caracterização dos genes que codificam essas enzimas em *M. fortuitum* são objeto de um outro projeto em nosso grupo.

Quanto às tetraciclinas e à tigeciclina, apenas esta última apresenta CIM50 e CIM90 baixas permitindo seu uso empírico. Apesar de não haver critérios interpretativos definidos pelo CLSI, Wallace e colaboradores propuseram o ponto de corte de 4 µg/ml, e portanto todos os isolados testados neste estudo seriam considerados sensíveis (Wallace, Brown-Elliott *et al.*, 2002; Fernandez-Roblas, Martin-De-Hijas *et al.*, 2008). Nossos dados contraindicam o uso de minociclina ou doxiciclina empiricamente para tratamento de infecções por *M. fortuitum*, e são compatíveis com as observações de alguns autores (Fernandez-Roblas, Martin-De-Hijas *et al.*, 2008; Cavusoglu, Gurpinar *et al.*, 2012).

Os dados obtidos neste trabalho permitem indicar o uso empírico de ciprofloxacina, moxifloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim, linezolida, imipenem, ampicilina e tigeciclina no tratamento de infecções causadas por *M. fortuitum*.

6 CONCLUSÕES

- Foram detectados três grupos clonais, sendo dois presentes na cidade de Campinas e o terceiro na cidade de Florianópolis;
- Foi observada a persistência do grupo clonal MFBRA2 na cidade de Campinas por seis anos;
- A maioria dos casos isolados em diferentes estados brasileiros pertence a grupos clonais distintos;
- O índice de similaridade de Dice mínimo para a identificação de um grupo clonal de *M. fortuitum* ao analisar fragmentos de restrição gerados por XbaI deve ser de 98%;
- Todos os isolados testados foram sensíveis à amicacina, tigeciclina, imipenem, ciprofloxacina, moxifloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim e linezolida;
- As taxas de sensibilidade de 89% para claritromicina e 35% para doxiciclina não permitem seus usos empíricos no tratamento das infecções por *M. fortuitum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKAMBI, T. et al. *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, n. Pt 1, p. 133-43, Jan 2006. ISSN 1466-5026 (Print)

1466-5026 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403878> >.

ADEKAMBI, T. et al. Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1268-73, Apr 2006. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597850> >.

ADJEL, M. D. et al. Acetylation and nitrosation of ciprofloxacin by environmental strains of mycobacteria. **Can J Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 144-7, Jan 2007. ISSN 0008-4166 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17496960 >.

ALSTEENS, D. et al. Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. **Pflugers Arch**, v. 456, n. 1, p. 117-25, Apr 2008. ISSN 0031-6768 (Print)

0031-6768 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18043940 >.

ANGELI, K. et al. [*Mycobacterium fortuitum* skin infection occurring after a facelift]. **Ann Dermatol Venereol**, v. 131, n. 2, p. 198-200, Feb 2004. ISSN 0151-9638 (Print)

0151-9638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15026750> >.

ANVISA. **Infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido: Fluxo de Notificações, Diagnósticos Clínico e Microbiológico e Tratamento**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Ministério da Saúde 2009.

BASU, J. et al. Purification and partial characterization of a penicillin-binding protein from *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol**, v. 174, n. 14, p. 4829-32, Jul 1992. ISSN 0021-9193 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1624470 >.

BELLINZONI, M. et al. Structural plasticity and distinct drug-binding modes of LfrR, a mycobacterial efflux pump regulator. **J Bacteriol**, v. 191, n. 24, p. 7531-7, Dec 2009. ISSN 1098-5530 (Electronic).

Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19820093>.

BENGUALID, V. et al. *Mycobacterium fortuitum* and anaerobic breast abscess following nipple piercing: case presentation and review of the literature. **J Adolesc Health**, v. 42, n. 5, p. 530-2, May 2008. ISSN 1879-1972 (Electronic)

1054-139X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407050> >.

BETAL, D.; MACNEILL, F. A. Chronic breast abscess due to *Mycobacterium fortuitum*: a case report. **J Med Case Rep**, v. 5, p. 188, 2011a. ISSN 1752-1947 (Electronic)

1752-1947 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21592364>.

_____. Chronic breast abscess due to *Mycobacterium fortuitum*: a case report. **J Med Case Reports**, v. 5, p. 188, 2011b. ISSN 1752-1947 (Electronic)

1752-1947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592364> >.

BOSIO, S. et al. *Mycobacterium fortuitum* prosthetic valve endocarditis: a case for the pathogenetic role of biofilms. **Cardiovasc Pathol**, Dec 21 2011. ISSN 1879-1336 (Electronic)

1054-8807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196518> >.

BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S. Structure, function and biogenesis of the mycobacterial cell wall. **Biochem Soc Trans**, v. 25, n. 1, p. 188-94, Feb 1997. ISSN 0300-5127 (Print)

0300-5127 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9056869>.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, Mar 19 2002. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11891304>.

BROWN-ELLIOTT, B. A. et al. Antimicrobial Susceptibility of Nontuberculous Mycobacteria From Eye Infections. **Cornea**, Feb 22 2012. ISSN 1536-4798 (Electronic)

0277-3740 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22362004> >.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; NASH, K. 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, Jul 2012. ISSN 1098-6618 (Electronic)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22763637 >.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, 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, Oct 2002. ISSN 0893-8512 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12364376 >.

BROWN-ELLIOTT, B. A. et al. Comparison of in vitro activities of gatifloxacin and ciprofloxacin against four taxa of rapidly growing mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 10, p. 3283-5, Oct 2002. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234861> <http://aac.asm.org/content/46/10/3283.full.pdf> >.

BROWN-ELLIOTT, B. A. et al. Five-year outbreak of community- and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 12, p. 4231-8, Dec 2011. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21998415 >.

BROWN, B. A. et al. Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *M. chelonae*-like organisms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 1, p. 180-4, Jan 1992. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317144> >.

CALLEN, E. C.; KESSLER, T. L. *Mycobacterium fortuitum* infections associated with laparoscopic gastric banding. **Obes Surg**, v. 21, n. 3, p. 404-6, Mar 2011. ISSN 1708-0428 (Electronic)

0960-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336391> >.

CARDOSO, A. M. et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes Infect**, v. 10, n. 14-15, p. 1552-7, Nov-Dec 2008. ISSN 1286-4579 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18950729 >.

CARSON, L. A. et al. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, n. 12, p. 3122-5, Dec 1988. ISSN 0099-2240 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3223772 >.

CARSON, L. A. et al. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. **Appl Environ Microbiol**, v. 36, n. 6, p. 839-46, Dec 1978. ISSN 0099-2240 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=104656 >.

CAVUSOGLU, C.; GURPINAR, T.; ECEMIS, T. Evaluation of antimicrobial susceptibilities of rapidly growing mycobacteria by Sensititre RAPMYCO panel. **New Microbiol**, v. 35, n. 1, p. 73-6, Jan 2012. ISSN 1121-7138 (Print)

1121-7138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378556> >.

CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. **Curr Opin Chem Biol**, v. 1, n. 4, p. 579-88, Dec 1997. ISSN 1367-5931 (Print)

1367-5931 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9667898 >.

CLEGG, H. W. et al. Infection due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex after augmentation mammoplasty: clinical and epidemiologic features. **J Infect Dis**, v. 147, n. 3, p. 427-33, Mar 1983. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6833792 >.

CLSI. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. CLSI document M24-A2.** 2011.

COLEMAN, N. V.; SPAIN, J. C. Distribution of the coenzyme M pathway of epoxide metabolism among ethene- and vinyl chloride-degrading *Mycobacterium* strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 10, p. 6041-6, Oct 2003. ISSN 0099-2240 (Print)

0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532060> >.

CORNELIUS, L. et al. Cluster of *Mycobacterium fortuitum* prosthetic joint infections. **J Surg Orthop Adv**, v. 16, n. 4, p. 196-8, Winter 2007. ISSN 1548-825X (Print)

1548-825X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053402> >.

CORTESIA, C. et al. The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 12, p. 2574-81, Dec 2010. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926395> >.

CYNAMON, M. H.; PALMER, G. S. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* to amoxicillin or cephalothin in combination with clavulanic acid. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 23, n. 6, p. 935-7, Jun 1983. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6604496> >.

DA COSTA CRUZ, J. C. *Mycobacterium fortuitum*: um novo bacilo ácido-resistente patogênico para o homem (New acid fast bacillus pathogenic for man) **Acta Med. (Rio de Janeiro)**, v. 1, p. 298-301, 1938.

DANILCHANKA, O.; PAVLENOK, M.; NIEDERWEIS, M. Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 9, p. 3127-34, Sep 2008. ISSN 1098-6596 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18559650 >.

DATAFOLHA. **Pesquisa Datafolha sobre a Cirurgia Plástica no Brasil**: DATAFOLHA 2009.

DE ROSSI, E. et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 8, p. 1931-7, Aug 1998. ISSN 0066-4804 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9687386 >.

DEVI, D. R. et al. Injection site abscess due to *Mycobacterium fortuitum*: a case report. **Indian J Med Microbiol**, v. 21, n. 2, p. 133-4, Apr-Jun 2003. ISSN 0255-0857 (Print)

0255-0857 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643000> >.

DUARTE, R. S. et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 7, p. 2149-55, Jul 2009. ISSN 1098-660X (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19403765 >.

ESTEBAN, J. et al. Prevalence of *erm* methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. **Clin Microbiol Infect**, May 2 2009. ISSN 1469-0691 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19438639 >.

ESTEBAN, J. et al. Detection of *lfrA* and *tap* efflux pump genes among clinical isolates of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 5, p. 454-6, Nov 2009. 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=19665358>.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in the Nomenclature - Genus *Mycobacterium***.
<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html> 2011.

_____. **List of Prokaryotic Names with Standing in the Nomenclature - Genus *Mycobacterium***.
<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html> 2012.

FABBIAN, F. et al. Pleural effusion in an immunocompetent woman caused by *Mycobacterium fortuitum*. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 9, p. 1375-8, Sep 2011. ISSN 1473-5644 (Electronic)

0022-2615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459911> >.

FATTORINI, L. et al. Resistance to beta-lactams in *Mycobacterium fortuitum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 5, p. 1068-72, May 1992. 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=1510395>.

FERNANDEZ-ROBLAS, R. et al. In vitro susceptibilities of rapidly growing mycobacteria to telithromycin (HMR 3647) and seven other antimicrobials. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 1, p. 181-2, Jan 2000. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602744> >.

FERNANDEZ-ROBLAS, R. et al. In vitro activities of tigecycline and 10 other antimicrobials against nonpigmented rapidly growing mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 11, p. 4184-6, Nov 2008. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725441> >.

FISCHEDER, R.; SCHULZE-ROBBECKE, R.; WEBER, A. Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. **Zentralbl Hyg Umweltmed**, v. 192, n. 2, p. 154-8, Sep 1991. ISSN 0934-8859 (Print).
 Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1750968>.

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>.

GARCIA-AGUDO, L. et al. [Assessment of in vitro susceptibility to antimicrobials of rapidly growing mycobacteria by E-test]. **Rev Med Chil**, v. 137, n. 7, p. 912-7, Jul 2009. ISSN 0034-9887 (Print)

0034-9887 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19802419> >.

GAYATHRI, R. et al. Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. **J Postgrad Med**, v. 56, n. 2, p. 76-8, Apr-Jun 2010. ISSN 0022-3859 (Print)

0022-3859 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20622384> >.

GEBO, K. A. et al. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* on a Human Immunodeficiency Virus Ward: transient respiratory tract colonization from a contaminated ice machine. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 1, p. 32-8, Jul 1 2002. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060872>

<http://cid.oxfordjournals.org/content/35/1/32.full.pdf> >.

GEVAUDAN, M. J. et al. [Sensitivity of 7 mycobacterial species to new quinolones]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 36, n. 5, p. 477-81, May 1988. ISSN 0369-8114 (Print)

0369-8114 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136429> >.

GILLESPIE, S. H. et al. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 2, p. 344-8, Aug 2005. ISSN 0305-7453 (Print)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956099>

<http://jac.oxfordjournals.org/content/56/2/344.full.pdf> >.

GRIFFITH, D. E. Nontuberculous mycobacteria. **Curr Opin Pulm Med**, v. 3, n. 2, p. 139-45, Mar 1997. ISSN 1070-5287 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9193860 >.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, n. 4, p. 367-416, Feb 15 2007. ISSN 1073-449X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17277290 >.

GUEVARA-PATINO, A. et al. Soft tissue infection due to *Mycobacterium fortuitum* following acupuncture: a case report and review of the literature. **J Infect Dev Ctries**, v. 4, n. 8, p. 521-5, Aug 2010. ISSN 1972-2680 (Electronic)

1972-2680 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818105> >.

GUILLEMIN, I.; CAMBAU, E.; JARLIER, V. Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 9, p. 2145-9, Sep 1995. ISSN 0066-4804 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8540734 >.

HALPERN, A. A.; NAGEL, D. A. *Mycobacterium fortuitum* infections: a review with two illustrative cases. **Clin Orthop Relat Res**, n. 136, p. 247-52, Oct 1978. ISSN 0009-921X (Print)

0009-921X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=729293 >.

HECTOR, J. S. et al. Large restriction fragment patterns of genomic *Mycobacterium fortuitum* DNA as strain-specific markers and their use in epidemiologic investigation of four nosocomial outbreaks. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 5, p. 1250-5, May 1992. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1583127> >.

HEISTEIN, J. B. et al. A prosthetic breast implant infected with *Mycobacterium fortuitum*. **Ann Plast Surg**, v. 44, n. 3, p. 330-3, Mar 2000. ISSN 0148-7043 (Print)

0148-7043 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10735228 >.

HERNANDEZ GARCIA, A. M. et al. [In vitro sensitivity of *Mycobacterium chelonae* strains to various antimicrobial agents]. **Microbiologia**, v. 11, n. 4, p. 485-90, Dec 1995. ISSN 0213-4101 (Print)

0213-4101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8588844> >.

HETSRONI, I. et al. *Mycobacterium fortuitum* infection following patellar tendon repair: a case report. **J Bone Joint Surg Am**, v. 92, n. 5, p. 1254-6, May 2010. ISSN 1535-1386 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439674> >.

HO, II; CHAN, C. Y.; CHENG, A. F. Aminoglycoside resistance in *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare*, and *Mycobacterium fortuitum*: are aminoglycoside-modifying enzymes responsible? **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 1, p. 39-42, Jan 2000. 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=10602720 >.

HOFFMAN, P. C. et al. Two outbreaks of sternal wound infection due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex. **J Infect Dis**, v. 143, n. 4, p. 533-42, Apr 1981. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7240799 >.

HOFLING-LIMA, A. L. et al. In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae* causing infectious keratitis after LASIK in Brazil. **Cornea**, v. 24, n. 6, p. 730-4, Aug 2005. ISSN 0277-3740 (Print)

0277-3740 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16015094> >.

HU, F. R. et al. The antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium chelonae* isolated from corneal ulcer. **Curr Eye Res**, v. 16, n. 10, p. 1056-60, Oct 1997. ISSN 0271-3683 (Print)

0271-3683 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330859> >.

IPPOLITO, J. A. et al. Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. **J Med Chem**, v. 51, n. 12, p. 3353-6, Jun 26 2008. ISSN 0022-2623 (Print)

0022-2623 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18494460 >.

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 >.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiol Lett**, v. 123, n. 1-2, p. 11-8, Oct 15 1994. ISSN 0378-1097 (Print)

0378-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7988876 >.

JUN, H. J. et al. Nontuberculous mycobacteria isolated during the treatment of pulmonary tuberculosis. **Respir Med**, v. 103, n. 12, p. 1936-40, Dec 2009. ISSN 1532-3064 (Electronic)

0954-6111 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576745> >.

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 >.

KAZUMI, Y.; MAEDA, S.; SUGAWARA, I. [Identification of mycobacteria by sequencing of *rpoB* gene and 16S *rRNA*]. **Kekkaku**, v. 81, n. 9, p. 551-8, Sep 2006. ISSN 0022-9776 (Print)

0022-9776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17037387> >.

KRESSEL, A. B.; KIDD, F. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium chelonae* and *Methylobacterium mesophilicum* caused by contamination of an automated endoscopy washer. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 22, n. 7, p. 414-8, Jul 2001. ISSN 0899-823X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11583208 >.

KUBICA, G. P.; BEAM, R. E.; PALMER, J. W. A Method for the Isolation of Unclassified Acid-Fast Bacilli from Soil and Water. **Am Rev Respir Dis**, v. 88, p. 718-20, Nov 1963. ISSN 0003-0805 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14082689 >.

KUMAR, S. et al. Multifocal Keloids Associated with *Mycobacterium fortuitum* following Intralesional Steroid Therapy. **J Lab Physicians**, v. 3, n. 2, p. 127-9, Jul 2011. ISSN 0974-7826 (Electronic)

0974-7826 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22219571> >.

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 >.

LABOMBARDI, V. J.; O'BRIEN A, M.; KISLAK, J. W. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* due to contaminated ice machines. **Am J Infect Control**, v. 30, n. 3, p. 184-6, May 2002. ISSN 0196-6553 (Print)

0196-6553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988715> >.

LAUSSUCQ, S. et al. Nosocomial *Mycobacterium fortuitum* colonization from a contaminated ice machine. **Am Rev Respir Dis**, v. 138, n. 4, p. 891-4, Oct 1988. ISSN 0003-0805 (Print)

0003-0805 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3202466 >.

LAVOLLAY, M. et al. The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-transpeptidases. **J Bacteriol**, v. 193, n. 3, p. 778-82, Feb 2011. ISSN 1098-5530 (Electronic)

0021-9193 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21097619 >.

LE DANTEC, C. et al. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 3, p. 1025-32, Mar 2002a. ISSN 0099-2240 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11872446 >.

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

LEONI, E. et al. Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. **J Appl Microbiol**, v. 87, n. 5, p. 683-8, Nov 1999. ISSN 1364-5072 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10594708 >.

LIU, J.; TAKIFF, H. E.; NIKAIIDO, H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. **J Bacteriol**, v. 178, n. 13, p. 3791-5, Jul 1996. ISSN 0021-9193 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8682782 >.

LIZASO, D. et al. [Breast implant infection by *Mycobacterium fortuitum* in a patient with systemic lupus erythematosus]. **Rev Chilena Infectol**, v. 28, n. 5, p. 474-8, Oct 2011. ISSN 0716-1018 (Print) 0716-1018 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22051625> >.

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 >.

MEYERS, H. et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 11, p. 1500-7, Jun 1 2002. ISSN 1537-6591 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12015697 >.

MONTEGO, F. et al. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 5, p. 436-41, Oct 2011. ISSN 1678-4391 (Electronic) 1413-8670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230849> >.

MUKHERJEE, T. et al. Biochemical characterization of the 49 kDa penicillin-binding protein of *Mycobacterium smegmatis*. **Biochem J**, v. 320 (Pt 1), p. 197-200, Nov 15 1996. ISSN 0264-6021 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8947487 >.

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). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9257748 >.

NAGORE, E. et al. Cutaneous infection with *Mycobacterium fortuitum* after localized microinjections (mesotherapy) treated successfully with a triple drug regimen. **Acta Derm Venereol**, v. 81, n. 4, p. 291-3, Aug-Sep 2001. ISSN 0001-5555 (Print)

0001-5555 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720180> >.

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). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19171799 >.

NASH, K. A. et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 2, p. 170-7, Feb 2005. ISSN 0305-7453 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15590712 >.

NGUYEN, D. Q. et al. Nasal infection due to *Mycobacterium fortuitum*. **Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis**, v. 128, n. 4, p. 197-9, Sep 2011. ISSN 1879-7296 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596645> >.

PADOVEZE, M. C. et al. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **J Hosp Infect**, v. 67, n. 2, p. 161-7, Oct 2007. ISSN 0195-6701 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17881086 >.

PARK, S. et al. Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens. **Respir Med**, v. 102, n. 3, p. 437-42, Mar 2008. ISSN 0954-6111 (Print)

0954-6111 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997087> >.

PORAT, M. D.; AUSTIN, M. S. Bilateral knee periprosthetic infection with *Mycobacterium fortuitum*. **J Arthroplasty**, v. 23, n. 5, p. 787-9, Aug 2008. ISSN 1532-8406 (Electronic)

0883-5403 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18534520> >.

QUINONES, C. et al. An outbreak of *Mycobacterium fortuitum* cutaneous infection associated with mesotherapy. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 24, n. 5, p. 604-6, May 2010. ISSN 1468-3083 (Electronic)

0926-9959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840199> >.

RAMON-GARCIA, S. et al. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 2, p. 252-9, Feb 2006. ISSN 0305-7453 (Print)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373429>

<http://jac.oxfordjournals.org/content/57/2/252.full.pdf> >.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Rev Sci Tech**, v. 20, n. 1, p. 21-54, Apr 2001. ISSN 0253-1933 (Print)

0253-1933 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11288513 >.

REALI, D. et al. [Mycobacteria in swimming pool water and the meaning of microbiological conventional indicators]. **Ann Ig**, v. 16, n. 1-2, p. 247-53, Jan-Apr 2004. ISSN 1120-9135 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15554531 >.

REDDY, A. K. et al. *In vitro* antibiotic susceptibility of rapidly growing nontuberculous mycobacteria isolated from patients with microbial keratitis. **Curr Eye Res**, v. 35, n. 3, p. 225-9, Mar 2010. ISSN 1460-2202 (Electronic)

0271-3683 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20373881>

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/02713680903502258> >.

REGNIER, S. et al. [Treatment of cutaneous infections due to *Mycobacterium fortuitum*: two cases]. **Ann Dermatol Venereol**, v. 135, n. 8-9, p. 591-5, Aug-Sep 2008. ISSN 0151-9638 (Print)

0151-9638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789296> >.

RENAUD, C. J. et al. The clinical course of rapidly growing nontuberculous mycobacterial peritoneal dialysis infections in Asians: A case series and literature review. **Nephrology (Carlton)**, v. 16, n. 2, p. 174-9, Feb 2011. ISSN 1440-1797 (Electronic)

1320-5358 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272129> >.

RIPOLL, F. et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5660, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19543527 >.

RODRIGUES, L. et al. The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. **Int J Antimicrob Agents**, Sep 7 2009. ISSN 1872-7913 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19740629 >.

ROSSI-FEDELE, G. et al. Incidence and behaviour of Tn916-like elements within tetracycline-resistant bacteria isolated from root canals. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 4, p. 218-22, Aug 2006. ISSN 0902-0055 (Print)

0902-0055 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16842505 >.

RUIZ-ARAGON, J. et al. [Susceptibility to antimicrobial agents of rapidly growing mycobacteria]. **Rev Esp Quimioter**, v. 20, n. 4, p. 429-32, Dec 2007. ISSN 0214-3429 (Print)

0214-3429 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563216> >.

SABAGH, B. P. et al. Comparative study with two different enrichments in the culture media used in the disinfectant efficacy assay. **J Microbiol Methods**, v. 88, n. 2, p. 255-62, Feb 2012. ISSN 1872-8359 (Electronic)

0167-7012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197720> >.

SAMPAIO, J. L. et al. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 2, p. 142-9, Feb 2006. ISSN 1198-743X (Print)

1198-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441452> >.

SAMPAIO, J. L. et al. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3201-7, Sep 2006. ISSN 0095-1137 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16954248 >.

SAMPAIO, J. L. et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 55, n. 2, p. 107-18, Jun 2006. ISSN 0732-8893 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16529900 >.

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). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12453216 >.

SANTOS, A. et al. Activity of various drugs alone or in combination against *Mycobacterium fortuitum*. **J Infect Chemother**, v. 16, n. 1, p. 64-7, Feb 2010. ISSN 1437-7780 (Electronic) 1341-321X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20063030> >.

SERRA, C. et al. Unusual clinical presentation of *Mycobacterium fortuitum* infection in an immunocompetent woman. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 5, p. 1663-5, May 2007. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360837> >.

SHEN, G. H. et al. *In vitro* activities of isepamicin, other aminoglycosides, and capreomycin against clinical isolates of rapidly growing mycobacteria in Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 5, p. 1849-51, May 2007. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17353252> <http://aac.asm.org/content/51/5/1849.full.pdf> >.

SHIH, J. Y. et al. Nontuberculous mycobacteria isolates: clinical significance and disease spectrum. **J Formos Med Assoc**, v. 96, n. 8, p. 621-7, Aug 1997. ISSN 0929-6646 (Print) 0929-6646 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9290272> >.

SNEATH, P. H. A. The Mycobacteria. In: HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 1st. Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, 1986. cap. 16, p.1435-1457. ISBN 0-683-07893-3.

SNIEZEK, P. J. et al. Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. **Arch Dermatol**, v. 139, n. 5, p. 629-34, May 2003. ISSN 0003-987X (Print) 0003-987X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12756100> >.

STEPHAN, J. et al. The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients. **Mol Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 714-30, Nov 2005. 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=16238622 >.

SUNGKANUPARPH, S.; SATHAPATAYAVONGS, B.; PRACHARKTAM, R. Infections with rapidly growing mycobacteria: report of 20 cases. **Int J Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 198-205, Sep 2003. ISSN 1201-9712 (Print)

1201-9712 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563223> >.

TIWARI, T. S. et al. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 8, p. 954-62, Apr 15 2003. ISSN 1537-6591 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12684906 >.

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). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1864271 >.

UDOU, T. Comparative evaluation of the in vitro antimycobacterial activities of six aminoglycoside antibiotics using an agar dilution method. **J Chemother**, v. 18, n. 6, p. 610-6, Dec 2006. ISSN 1120-009X (Print)

1120-009X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17267338> >.

UTRUP, L. J. et al. Susceptibilities of nontuberculosis mycobacterial species to amoxicillin-clavulanic acid alone and in combination with antimycobacterial agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 7, p. 1454-7, Jul 1995. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7492084> >.

VEMULAPALLI, R. K. et al. Emergence of resistance to clarithromycin during treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection: case report and literature review. **J Infect**, v. 43, n. 3, p. 163-8, Oct 2001. ISSN 0163-4453 (Print)

0163-4453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11798252> >.

VIANA-NIERO, C. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 850-5, Mar 2008. ISSN 1098-660X (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18174307 >.

VILLANUEVA, A. et al. Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis**, v. 24, n. 6, p. 1147-53, Jun 1997. ISSN 1058-4838 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9195073 >.

VINCENT, V.; GUTIÉRREZ, M. C. *Mycobacterium*: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria. In: MURRAY, P. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington D.C.: American Society for Microbiology, v.1, 2007. cap. 37,

VUGIA, D. J. et al. Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 4, p. 616-8, Apr 2005. ISSN 1080-6040 (Print)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829204> >.

WALLACE, R. J., JR. et al. Comparison of the in vitro activity of the glycyclcline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 10, p. 3164-7, Oct 2002. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234839>

<http://aac.asm.org/content/46/10/3164.full.pdf> >.

WALLACE, R. J., JR. et al. Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 3, p. 764-7, Mar 2001. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181357>

<http://aac.asm.org/content/45/3/764.full.pdf> >.

WALLACE, R. J., JR.; BROWN, B. A.; GRIFFITH, D. E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 52, p. 453-90, 1998. ISSN 0066-4227 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9891805 >.

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 >.

WALLACE, R. J., JR. et al. Disk diffusion testing with polymyxin and amikacin for differentiation of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. **J Clin Microbiol**, v. 16, n. 6, p. 1003-6, Dec 1982. ISSN 0095-1137 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6298271 >.

WINTHROP, K. L. et al. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. **N Engl J Med**, v. 346, n. 18, p. 1366-71, May 2 2002. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986410> >.

WINTHROP, K. L. et al. The clinical management and outcome of nail salon-acquired *Mycobacterium fortuitum* skin infection. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 1, p. 38-44, Jan 1 2004. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679446> >.

WIRMER, J.; WESTHOF, E. Molecular contacts between antibiotics and the 30S ribosomal particle. **Methods Enzymol**, v. 415, p. 180-202, 2006. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17116475 >.

WOODS, G. L. et al. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 656-61, Feb 2000. ISSN 0095-1137 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655363 >.

YANG, S. C. et al. High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 6, p. 1958-62, Jun 2003. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12760874> >.