**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

# Caracterização Fenotípica e Genotípica da Resistência a Antimicrobianos em Micobactérias de Crescimento Rápido

**Juliana Coutinho Campos**

**Dissertação para obtenção do grau de**

**MESTRE**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio**

São Paulo

2013

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

Campos, Juliana Coutinho
C198c Caracterização fenotípica e genotípica da resistência a antimicrobianos em micobactérias de crescimento rápido / Juliana Coutinho Campos. -- São Paulo, 2013.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Microbiologia clínica 2. Droga : Resistência em microorganismo : Microbiologia médica I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello, orientador.

616.0756 CDD

**Juliana Coutinho Campos**

# Caracterização Fenotípica e Genotípica da Resistência a Antimicrobianos em Micobactérias de Crescimento Rápido

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de MESTRE.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio**

São Paulo

2013

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Juliana Coutinho Campos**

**Caracterização Fenotípica e Genotípica da Resistência a Antimicrobianos em Micobactérias de Crescimento Rápido**

Comissão Julgadora da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

_____

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

Orientador / Presidente

_____

1° examinador

_____

2° examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2013.

**DEDICO ESTE TRABALHO...**

Ao meu **pai**, meu herói, meu exemplo de humildade e caridade.

À minha **mãe**, minha heroína e amiga, meu exemplo de amor e solidariedade.

Ao meu **irmão**, pelo amor infinito.

Ao meu **namorado**, pela ajuda, paciência, companhia e amor.

Ao meu **orientador**, Jorge Sampaio, pela dedicação, ensinamentos, disponibilidade e oportunidade.

**AGRADEÇO...**

À **Deus**, pela sabedoria, força e confiança.

Aos meus **pais e meu irmão**, pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida. Pai e Mãe sem vocês eu não teria conseguido chegar onde estou. Amo vocês!

Ao meu **namorado**, pelo amor e companheirismo. Você é mais do que um namorado, é um amigo, sempre disposto a me ajudar, me ensinar e aprender comigo. Amo você!

Ao **Profº. Dr. Jorge Sampaio**, pessoa indescritível, não tenho palavras para agradecer a imensa oportunidade de fazer parte de sua trajetória profissional. Obrigada por sempre acreditar em mim e por me ajudar em meu amadurecimento profissional. Minha eterna gratidão.

À **Profª. Dra. Elsa Masae Mamizuka**, por me receber em seu laboratório e pela disponibilidade oferecida.

À técnica, **Fabiana**, pelo auxílio no projeto, conversas diversas e amizade.

Aos meus **amigos** do Laboratório de Microbiologia Clínica, pela descontração, debates científicos e auxílio no término deste projeto de pesquisa. Cito-os: Artemir, Alexandre, Darlan, Leila, Mayne, Andrey, Juliana, John, Hadassa, Renée, Mónica, Lara.

À **Patrícia Sacramento**, pelo auxílio nos sequenciamentos de DNA no Instituto Fleury.

Aos professores da **banca de qualificação**, Nilton, Erica e Silvia, pela contribuição dada a este trabalho.

Ao **Instituto Fleury** por disponibilizar os isolados do banco de micobactérias, sem os quais este estudo não seria possível.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo suporte financeiro ao projeto (processo 2010/00807-3).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela bolsa oferecida.

“O sucesso é o resultado da concretização das metas estabelecidas. E as metas surgem de sonhos. E os sonhos advêm do ideal que está dentro de cada um. Acredite em você!”

Elpídio Fernandes da Silva

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso – Parte I (ABNT). Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro e colaboradores. 2ª ed. revisada e ampliada. São Paulo, 2009.

## RESUMO

CAMPOS, J.C., Caracterização Fenotípica e Genotípica da Resistência a Antimicrobianos em Micobactérias de Crescimento Rápido. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2013.

As micobactérias de crescimento rápido causam infecções pulmonares, infecções relacionadas a traumas cutâneos e aos cuidados com a saúde. Há um número reduzido de opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções e os dados nacionais sobre os determinantes genéticos dessa resistência são escassos. Duas classes de antimicrobianos importantes no tratamento são as fluorquinolonas e os macrolídeos. Enquanto a maioria dos isolados do Grupo *M. chelonae-abscessus* apresenta resistência intrínseca às fluorquinolonas, e são sensíveis aos macrolídeos, a maioria dos isolados do Grupo *M. fortuitum* é sensível às fluorquinolonas e expressa RNA-metilases que impedem a ação dos macrolídeos. Os determinantes da resistência às fluorquinolonas conhecidos em micobactérias são mutações no gene *gyrA* e para os macrolídeos é a expressão de genes *erm*, que codificam RNA-metilases. Nos dois casos os determinantes tem localização cromossômica. Outros determinantes de resistência podem ter localização plasmidial, a exemplo do gene *aacA4'-8,* presente em plasmídio do grupo de incompatibilidade IncP, detectado em *M. abscessus*, que codifica resistência à kanamicina e tobramicina. Neste estudo foram avaliados: a correlação entre a susceptibilidade ao ciprofloxacino e moxifloxacino e presença de mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*; a susceptibilidade à claritromicina e presença de genes que codificam RNA-metilases; a presença de plasmídios do grupo de incompatibilidade IncP em diferentes espécies de micobactérias; a estabilidade e a transferência por conjugação do plasmídio pBRA-100; a relação clonal entre isolados que albergam plasmídios IncP e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de uma coleção de isolados da espécie *M. abscessus*. Cento e vinte e dois isolados dos Grupos *M. abscessus* e *M. fortuitum* foram analisados quanto às concentrações inibitórias mínimas, por microdiluição, utilizando-se o painel RAPMYCO®. As sequências parciais dos genes *gyrA* e *gyrB* e a presença de genes que codificam RNA-metilases foram determinadas em 69 e 59 desses isolados, respectivamente. A presença de plasmídios do grupo IncP foi determinada por PCR e os produtos de amplificação tiveram suas sequencias caracterizadas. A estabilidade do plasmídio pBRA-100 em *Escherichia coli* TOP10® foi avaliada realizando-se repiques sucessivos por 57 dias e semeadura em ágar LB contendo kanamicina. A transferência horizontal foi avaliada por ensaio de conjugação com *E. coli* J53 resistente à azida sódica. Em *M. abscessus* não houve diferença entre as sequências da região QRDR de GyrA e GyrB entre isolados sensíveis e resistentes ao ciprofloxacino. Em *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* todos os isolados testados apresentaram genes *erm;* entretanto não foi observada correlação entre a presença dos genes e resistência indutiva à claritromicina. O gene *erm(45),* descrito neste trabalho, foi detectado apenas em *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Os ensaios de microdiluição evidenciaram que os antimicrobianos mais ativos contra *M. abscessus* subsp. *abscessus* foram amicacina (89%), tigeciclina (96%) e claritromicina (86%). Apenas nos dois isolados da espécie *M. fortuitum* resistentes ao ciprofloxacino foi detectada a substituição S83W na proteína GyrA. Trata-se de substituição ainda não

descrita em micobactérias. Não foi observada correlação entre substituições em GyrB e resistência ao ciprofloxacino ou moxifloxacino. O gene *erm(46*), descrito neste estudo, foi detectado em 65% dos isolados. Nos demais isolados foram detectados três outros genes: *erm(47*), *erm(48)* e *erm(49)*, ainda não descritos. Os plasmídios IncP foram detectados apenas em "*M. massiliense"* pertencentes a três grupos clonais distintos com índice de similaridade maior que 92%, quando analisados por ERIC-PCR. Houve sucesso na conjugação entre *E. coli* TOP-Myco e *E. coli* J53. Os ensaios de estabilidade evidenciaram que o plasmídio pBRA-100 é estável em *E. coli* com aproximadamente 100% da população bacteriana albergando o plasmídio após 57 subcultivos.

**Palavras-chave:** resistência antimicrobiana, plasmídios, fluorquinolonas, GyrA, macrolídeos, RNA-metilase, micobactérias de crescimento rápido.

**ABSTRACT**

CAMPOS, J.C., Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in Rapidly Growing Mycobacteria. **Dissertation (Master's degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo**, São Paulo, 2013.

The rapidly growing mycobacteria cause lung infections, skin infections related to trauma and health care associated infections. There are a limited number of therapeutic options for treating these infections and national data on the genetic determinants of this resistance are scarce. Two major classes of antimicrobials used in treatment of these infections are macrolides and fluoroquinolones. While the majority of the isolates from *M. chelonae-abscessus* Group have intrinsic resistance to fluoroquinolones, and are sensitive to macrolides, most isolates from *M. fortuitum* Group are sensitive to fluoroquinolones and express RNA methylases that prevent the action of macrolides. The known fluoroquinolones resistance determinants in to mycobacteria are mutations in the*gyrA* gene and for macrolides the main determinant is the expression of *erm* genes which encode RNA methylases. In both cases the determinants are located at the chromosome. Other resistance determinants may have a plasmidial location, such as *aacA4'-8* gene, present in the pBRA100 plasmid detected in *M. abscessus*, which encodes resistance to kanamycin and tobramycin. This study evaluated the correlation between the susceptibility to ciprofloxacin and moxifloxacin and mutations in genes *gyrA* and *gyrB*; susceptibility to clarithromycin and the presence of RNA-methylases encodinggenes , the presence of plasmids of the incompatibility group IncP in different species mycobacteria; stability and conjugal transfer of plasmid pBRA-100; the clonal relationship between isolates harboring plasmids IncP and antimicrobial susceptibility profile of a collection of isolates of *M. abscessus* . One hundred and twenty-two isolates of *M. chenolae-abscessus* and *M. fortuitum* Groups were analyzed for their minimal inhibitory concentrations by microdilution, using the RAPMYCO ® Panel. The partial sequences of the genes *gyrA* and *gyrB* and the presence of genes encoding RNA methylases were determined in 69 and 59 isolates, respectively. The presence of IncP group plasmids was determined by PCR and the sequence of PCR products were characterized. The stability of the pBRA-100 plasmid in *Escherichia coli* TOP10® was evaluated by performing successive subcultures for 57 days, and plating on LB agar containing kanamycin. The horizontal transfer was evaluated by conjugation with *E. coli* J53 a sodium azide resistant strain. In *M. abscessus* no differences between the sequences of the QRDR region of *gyrA* or *gyrB* among isolates susceptible and resistant to ciprofloxacin were observed. In *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii* all isolates tested had *erm* genes; however there was no correlation between the presence of these genes and inducible resistance to clarithromycin. The *erm*(45), gene described in this paper, was only detected in *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Microdilution tests showed that the most active antibiotics against *M. abscessus* subsp. *abscessus* were amikacin (89%), tigecycline (96%) and clarithromycin (86%). In only in two *M. fortuitum* isolates resistant to ciprofloxacin the amino acid substitution S83W was detected in GyrA. This substitution had not been described mycobacteria. No correlation was observed between substitutions in GyrB and resistance to ciprofloxacin or moxifloxacin. The *erm*(46) gene described in this study, was detected in 65% of the isolates. In the remaining isolates other three not

yet described genes were detected: *erm*(47), *erm*(48) and *erm*(49). IncP plasmids were detected only in "*M. massiliense*" belonging to three clonal groups with at similarity index greater than 92% when analyzed by ERIC-PCR.We succeeded in conjugating *E. coli* TOP-Myco and *E. coli* J53. The stability tests showed that the plasmid pBRA-100 is stable in *E. coli* since approximately 100% of the bacterial population harbored the plasmid after 57 subcultures.

**Keywords:** antimicrobial resistance, plasmids, fluoroquinolones, gyrA, macrolides, RNA methylase, rapidly growing mycobacteria.

**SUMÁRIO**


| | | |
|---|---|---|
| **1** | **INTRODUÇÃO** | **14** |
| 1.1 | Importância clínica | 14 |
| 1.2 | Análise de clonalidade | 16 |
| 1.3 | Taxonomia das micobactéria não tuberculosas | 16 |
| 1.4 | Resistência antimicrobiana e seus determinantes genéticos | 18 |
| 1.4.1 | Betalactâmicos | 20 |
| 1.4.2 | Oxazolidinonas | 22 |
| 1.4.3 | Tetraciclinas e glicilciclinas | 22 |
| 1.4.4 | Fluorquinolonas | 23 |
| 1.4.5 | Macrolídeos | 27 |
| 1.5 | Resistência antimicrobiana e genes de localização plasmidial | 29 |
| **2** | **JUSTIFICATIVA** | **31** |
| **3** | **OBJETIVOS** | **32** |
| 3.1 | Objetivo Geral | 32 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 32 |
| **4** | **MATERIAL E MÉTODOS** | **33** |
| 4.1 | Isolados Bacterianos | 33 |
| 4.2 | Extração de DNA por lise térmica | 34 |
| 4.3 | Amplificação para sequenciamento parcial de genes determinantes de resistência à fluorquinolonas | 34 |
| 4.4 | Amplificação para sequenciamento integral de genes determinantes de resistência à macrolídeos | 35 |
| 4.5 | Detecção e sequenciamento da região de íterons de plasmídios IncP | 36 |
| 4.6 | Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensuns (ERIC-PCR) | 38 |
| 4.7 | Microdiluição em caldo | 38 |
| 4.8 | Extração DNA plasmidial enterobactérias | 39 |
| 4.9 | Diluição em ágar | 40 |
| 4.10 | Ensaio de conjugação | 41 |

4.10.1 Enterobactérias 41
4.10.2 Micobactérias 42
4.11 Ensaio de estabilidade plasmidial 43

**5 RESULTADOS 45**
5.1 Determinantes de resistência à fluorquinolonas 45
5.1.1 Análise das sequências de aminoácidos de GyrA 45
5.1.2 Análise das sequências de aminoácidos de GyrB 46
5.2 Determinantes de resistência à macrolídeos 51
5.3 Identificação de plasmídios do grupo de incompatibilidade P (IncP) 57
5.4 Avaliação da clonalidade 60
5.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade 61
5.6 Perfil plasmidial da cepa *Escherichia coli* TOP-Myco 65
5.7 Ensaios de conjugação 66
5.8 Ensaio de estabilidade plasmidial 67

**6 DISCUSSÃO 68**
6.1 Determinantes de resistência à fluorquinolonas 68
6.2 Determinantes de resistência à macrolídeos 69
6.3 Identificação de plasmídios do grupo de incompatibilidade P (IncP) 71
6.4 Avaliação da clonalidade 72
6.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade 72
6.6 Ensaios de conjugação 74
6.7 Ensaios de estabilidade plasmidial em *Escherichia coli* 74

**7 CONCLUSÕES 76**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 78**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância clínica

A maioria das espécies de micobactérias não tuberculosas (MNT) pode ser detectada no ambiente, particularmente em ambientes aquáticos, incluindo sistemas de abastecimento urbanos. Este fato potencialmente leva a uma frequente exposição humana a esses microrganismos; entretanto existe uma desproporção entre a potencial grande exposição e o número de casos de infecções por MNT.

As MNT, particularmente *Mycobacterium avium* e *M. intracellulare*, tiveram grande impacto em morbidade e mortalidade de pacientes com AIDS, no período que antecedeu o uso da terapia antiretroviral altamente efetiva. Recentemente tem sido relatado um aumento na prevalência de doenças pulmonares por MNT (Daley and Griffith 2010; Gopinath and Singh 2010). As micobactérias de crescimento rápido (MCR) - cerca de 60 espécies já caracterizadas – consistem um subgrupo dentro do grupo das MNT. Possuem algumas particularidades, sendo a mais importante a capacidade de formar colônias visíveis em meio sólido em até sete dias. São encontradas principalmente no solo, sistemas hídricos naturais, tubulações de sistemas de distribuição de água potável, águas de recreação e sistemas de esgoto (Brown-Elliott and Wallace 2002).

As espécies de MCR mais frequentemente detectadas em casos de doença em seres humanos pertencem aos grupos *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae-abscessus* e *M. smegmatis* (Griffith, Aksamit et al. 2007). As apresentações clínicas mais frequentes são infecções pulmonares em indivíduos com patologias subjacentes, como bronquiectasias, doença pulmonar obstrutiva crônica ou fibrose cística (Griffith, Aksamit et al. 2007). As MCR, assim como as demais micobactérias, são patógenos tipicamente intracelulares, capazes de sobreviver e se multiplicar em macrófagos e amebas de vida livre (Brown-Elliott and Wallace 2002). Infecções por MCR não relacionadas com procedimentos médicos ou cosmiátricos também podem

ocorrer e, geralmente, estão associados à exposição à água de recreação contaminada com um grande número de bactérias (Dytoc, Honish et al. 2005). Nesses casos o mais comum é a ocorrência de lesões cutâneas.

Em função de sua ubiquidade no ambiente, infecções relacionadas aos cuidados com a saúde, causadas por MCR, ocorrem devido a falhas de processos de esterilização de soluções, instrumentos cirúrgicos, ou dispositivos médicos. Publicações recentes indicam a ocorrência de surtos e aumento no número de casos de infecções em implantes de prótese mamária, procedimentos médicos vídeo-assistidos e procedimentos cosmiátricos em vários países, incluindo o Brasil (Macadam, Mehling et al. 2007; Padoveze, Fortaleza et al. 2007; Duarte, Lourenco et al. 2009; Boettcher, Bengtson et al. 2010; Correa, Catano et al. 2010; Drage, Ecker et al. 2010; Goldman, Caron et al. 2010; Quinones, Ramalle-Gomara et al. 2010; Thibeaut, Levy et al. 2010; Aitken, Limaye et al. 2012).

Esse crescente número de casos e surtos pode ser devido, pelo menos em parte, à tolerância bem conhecida ao glutaraldeído alcalino, em isolados do grupo *Mycobacterium chelonae* - *Mycobacterium abscessus* e à tolerância a desinfetantes (Carson, Petersen et al. 1978; Hardie 1985; van Klingeren and Pullen 1993; Lorena, Pitombo et al. 2010).

No Brasil, os surtos causados por MCR tem sido detectados desde 1998, principalmente nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo. Os primeiros surtos descritos no Brasil ocorreram em cirurgias para correção de miopia, injeções intradérmicas (sessões de mesoterapia) ou implantes de próteses mamárias (Sampaio, Chimara et al. 2006; Sampaio, Viana-Niero et al. 2006). No período de agosto de 2006 a julho de 2007, mais de 1.000 casos de infecção por MCR foram notificados à Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (Duarte, Lourenco et al. 2009). A análise dos isolados por eletroforese em campos pulsados evidenciou que em diversos hospitais e estados brasileiros os surtos foram causados por um único clone de *M. abscessus* subsp *bolletii* (*M. massiliense*), denominado BRA-100 (Duarte, Lourenco et al. 2009; Monego, Duarte et al. 2011).

## 1.2 Análise de clonalidade

O método mais amplamente utilizado para a avaliação da relação clonal entre isolados do gênero *Mycobacterium* é a eletroforese em campos alternados, técnica que consiste na inclusão da suspensão bacteriana em blocos de agarose, extração do DNA genômico, digestão do DNA com uma enzima de restrição e separação dos fragmentos em um sistema computadorizado de eletroforese em gel de agarose, que permite a separação de fragmentos grandes de DNA. Apesar de ser o método de eleição em função de sua reprodutibilidade, comparabilidade de resultados obtidos em laboratórios diferentes, e existência de critérios objetivos para interpretação, é trabalhoso e utiliza equipamento de elevado custo. Uma alternativa já validada para uso nas espécies *M. abscessus* e *M. chelonae* é a técnica de ERIC-PCR, que consiste na utilização dos iniciadores originalmente descritos para amplificar sequências repetitivas de enterobactérias. Quando utilizado para tipagem de micobactérias a temperatura de anelamento é reduzida, permitindo a ocorrência de pareamento inespecífico, gerando múltiplos fragmentos que são separados por eletroforese em gel de agarose. As vantagens do método são a disponibilidade do resultado no mesmo dia de execução e baixo custo, mas tem como desvantagem a necessidade de incluir todos os isolados analisados em uma mesma batelada de amplificação (Tenover 1995; Sampaio, Chimara et al. 2006).

## 1.3 Taxonomia das micobactérias não tuberculosas

A taxonomia do gênero *Mycobacterium* tem sofrido atualizações constantes e atualmente são reconhecidas 162 espécies e 13 subespécies (Euzéby 2013). Na década passada, a análise da sequência do gene 16S rRNA de micobactérias não tuberculosas (MNT) levou à descrição de 45 novas espécies (Tortoli, Bartoloni et al. 2001).

A crescente recuperação de MCR do meio ambiente e fontes clínicas e a disponibilidade de sequenciadores de DNA tem impulsionado o desenvolvimento de métodos laboratoriais para identificá-las com maior precisão. A identificação precisa de espécies de MCR é um passo fundamental para a descrição de infecções oportunistas emergentes por elas causadas. Métodos laboratoriais fenotípicos isoladamente são incapazes de diferenciar grande parte das espécies de MCR, em função da superposição de perfis (Adekambi, Colson et al. 2003).

O sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido utilizado como o método de primeira linha na identificação de isolados de micobactérias não usuais e para discriminação de MNT emergentes. Entretanto, a discriminação de espécies baseada na sequência do gene 16S rRNA é discutível, por seu menor poder discriminatório em relação a outros genes. Além disso, resultados ambíguos podem ser obtidos devido a possível presença de duas cópias do gene 16S rRNA, com diferentes sequências, no mesmo microrganismo (Adekambi and Drancourt 2004). Micobactérias de crescimento rápido usualmente possuem duas cópias de operon ribossômico enquanto as de crescimento lento possuem um único operon (Bercovier, Kafri et al. 1986; Cox and Katoch 1986).

O sequenciamento parcial do *rpoB* - gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase bacteriana - tem sido proposto como ferramenta para a identificação precisa de MCR, sendo considerada por alguns autores como a mais eficaz na taxonomia deste grupo de microrganismos (Adekambi, Colson et al. 2003; Adekambi and Drancourt 2004; Adekambi, Berger et al. 2006).

O método do PRA-*hsp*65 é o mais amplamente utilizado para identificação de MCR e se baseia na amplificação da chamada região de Telenti do gene *hsp*65, digestão do produto amplificado com as enzimas HaeIII e BstEII separadamente e análise do tamanho dos fragmentos de restrição. . Apesar do custo reduzido, apresenta limitações na discriminação entre *M. mageritense* e *M. houstonense* e entre as espécies *M. chelonae* e *M. mucogenicum* (Telenti, Marchesi et al. 1993; Adekambi, Colson et al. 2003).

Apesar do crescente uso do sequenciamento de múltiplos genes para a definição de novas espécies de micobactérias, a hibridização DNA-DNA ainda é considerada o padrão ouro. Exemplo dessa contínua discussão é a recente

reclassificação das espécies do grupo *M. chelonae-abscessus. M. abscessus* passou a ser designado *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *"M. massiliense" e "M. bolletii"* foram reunidos em uma única subespécie *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Sampaio 2010; Leao, Tortoli et al. 2011).

## 1.4 Resistência antimicrobiana e seus determinantes genéticos

As MCR são intrinsicamente resistentes a muitos antimicrobianos, seja pela presença de uma parede rica em ácidos graxos que atua como uma barreira a moléculas grandes, seja como uma barreira hidrofóbica. Além disso, há sistemas de extrusão e mutações em genes alvo (Nguyen and Thompson 2006; Nessar, Cambau et al. 2012). A concomitância desses mecanismos reduz o número de drogas ativas para o tratamento das infecções causadas por essas bactérias. As duas espécies de MCR mais prevalentes em infecções humanas são *M. abscessus* e *M. fortuitum* (Brown-Elliott and Wallace 2002). Enquanto *M. fortutuim* é usualmente sensível a fluorquinolonas, doxiciclina e sulfametoxazol, *M. abscessus* é usualmente resistente, o que limita as opções terapêuticas (Nessar, Cambau et al. 2012). Esta espécie possui resistência intrínseca à maioria das drogas antituberculosas, incluindo isoniazida, rifampicina, etambutol (Sreevatsan, Stockbauer et al. 1997) . Contudo, *M. abscessus* é usualmente sensível *in vitro* a alguns agentes parenterais a exemplo de amicacina, cefoxitina, imipenem e tigeciclina, e aos macrolídeos e azalídeos claritromicina e azitromicina. A combinação de amicacina intravenosa com cefoxitina ou imipenem e um macrolídeo oral tem sido recomendado pela American Thoracic Society e pela Infectious Disease Society of America (Griffith, Aksamit et al. 2007) como tratamento empírico às infecções graves .

Esteban e colaboradores (2008) demostraram que muitas infecções humanas causadas por MCR estão relacionadas à formação de biofilme (Esteban, Martín-de-Hijas et al. 2008), como infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter, infecções de sítios cirúrgicos, infecções de próteses articulares, infecções do trato respiratório em pacientes com fibrose cística, dentre outras (Ortíz-Pérez, Martín-de-Hijas et al. 2011).

O desenvolvimento do biofilme é um fator importante na resistência a antimicrobianos, sendo que diferentes estudos tem mostrado a resistência *in vitro* de biofilmes formados por MCR contra desinfetantes ou antibióticos, incluindo resistência a amicacina e claritromicina em *M. abscessus* incorporados em biofilme (Bardouniotis, Huddleston et al. 2001; Teng and Dick 2003; Greendyke and Byrd 2008; Ortíz-Pérez, Martín-de-Hijas et al. 2011).

Não há consenso quanto ao tratamento ideal para essas infecções em função da inexistência de estudos clínicos randomizados. Além disso, o perfil de susceptibilidade é variável em função da espécie (Tabela 1). As diretrizes da American Thoracic Society, assim como aquela publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA 2009), baseiam-se em relatos de casos e experiências pessoais (Jeon, Kwon et al. 2009; Lyu, Jang et al. 2011). A duração mínima do tratamento é de seis meses, e nos casos em que o acometimento não é focal e não há ressecção cirúrgica, pode haver recidiva. Portanto uma associação de antimicrobianos que resulte em ação bactericida, e a disponibilidade de um maior número de opções terapêuticas são extremamente desejáveis (Griffith, Aksamit et al. 2007; Nessar, Cambau et al. 2012). Em função do número limitado de opções seria recomendável que todos os isolados clinicamente significantes fossem testados contra agentes antimicrobianos selecionados. O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomenda o método da microdiluição em caldo no teste de sensibilidade para as micobactérias de crescimento rápido, segundo do documento M24-A2 (CLSI 2011).

**Tabela 1** – Sensibilidade *in vitro* de algumas MNT para diversos agentes antimicobacterianos. Os símbolos representam a extensão aproximada da sensibilidade: '++: 90-100%; +: 60-90%; +/-: 30-60%; - : 0-30%. MAC: complexo *M. avium*; KAN: *M. kansasii*; ABS: *M. abscessus*; FOR: *M. fortuitum*; CHE: *M. chelonae*; MAL: *M. malmoense*; XEN: *M. xenopi*; MAR: *M. marinum*; HAE: *M. haemophilum*. Fonte: Wagner & Young, 2003.

| Antibiótico | MAC | KAN | ABS | FOR | CHE | MAL | XEN | MAR | HAE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rifampicina | ++ | ++ | - | - | - | - | ++ | ++ | ++ |
| Rifabutina | ++ | ++ | - | - | - | +/- | ++ | ++ | ++ |
| Isoniazida | - | ++ | - | - | - | - | ++ | - | |
| Etambutol | ++ | ++ | - | - | - | ++ | ++ | +/- | - |
| Pirazinamida | - | - | - | - | - | | | - | |
| Etionamida | ++ | ++ | | - | - | ++ | | | |
| Estreptomicina | ++ | ++ | - | - | - | - | + | +/- | |
| Kanamicina | ++ | | | +/- | +/- | ++ | | | +/- |
| Amicacina | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Tobramicina | | | | +/- | ++ | | | | |
| Cicloserina | ++ | | | - | - | ++ | | | ++ |
| PAS | - | | | - | - | - | | | |
| Capreomicina | - | - | | | - | - | - | | |
| Doxiciclina | - | +/- | - | +/- | - | | | + | +/- |
| Minociclina | - | ++ | - | + | +/- | | | ++ | |
| Tigeciclina | - | - | ++ | ++ | ++ | | | - | |
| Ciprofloxacino | ++ | ++ | - | ++ | - | +/- | ++ | - | ++ |
| Levofloxacino | ++ | ++ | - | ++ | - | ++ | ++ | +/- | ++ |
| Moxifloxacino | ++ | ++ | - | ++ | - | | ++ | ++ | ++ |
| Claritromicina | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| TMP-SMZ | - | + | - | ++ | - | | | ++ | +/- |
| Cefoxitina | - | | + | + | - | | | | |
| Clofazimina | +/- | | ++ | | - | | | | |
| Imipenem | | | +/- | ++ | +/- | | | ++ | |
| Linezolida | +/- | ++ | +/- | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | |
| Mefloquina | ++ | | | | | | | | |

### 1.4.1 Betalactâmicos

Imipenem e cefoxitina são utilizados no esquema inicial de tratamento, mas as concentrações inibitórias mínimas são elevadas e os betalactâmicos não apresentam maior concentração intracelular do que extracelular (Tulkens 1991). Isso representa uma limitação ao seu uso, já que as micobactérias são patógenos

intracelulares. Alguns autores demonstraram a potenciação da atividade *in vitro* de betalactâmicos quando da associação com tazobactam contra MNT (Kwon, Tomioka et al. 1995), e potenciação da ação da ceftazidima, quando associada ao sulbactam, contra *M. smegmatis* (Shrivastava, Shukla et al. 2009). A atividade bactericida da associação meropenem/clavulanato contra *M. tuberculosis*, assim como a inibição irreversível de sua betalactamase pelo clavulanato já foram demonstradas. (Hugonnet and Blanchard 2007). A presença de betalactamases já foi observada em *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* e *M. tuberculosis*, mas os determinantes genéticos foram caracterizados apenas em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* (Kasik and Peacham 1968; Wallace, Nash et al. 1985; Flores, Parsons et al. 2005). A resistência aos betalactâmicos pode também ser causada por alterações em porinas, usualmente por mutações que levam à perda da expressão, diminuindo a penetração do antimicrobiano na célula bacteriana (Trias, Jarlier et al. 1992; Danilchanka, Pavlenok et al. 2008). 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 and Chakrabarti 1997), mas não há publicação que tenha avaliado o papel dessas proteínas na resistência a betalactâmicos ou seus determinantes genéticos no grupo *M. chelonae-abscessus*. 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 a parede celular como 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 and Wallace 2002).

Os papéis das betalactamases, seus determinantes genéticos e inibição por inibidores de betalactamases, assim como porinas ou PBPs na resistência a betalactâmicos no grupo *M. chelonae-abscessus* e *M. fortuitum* necessitam ser elucidados.

### 1.4.2 Oxazolidinonas

Linezolida é uma oxazolidinona avaliada como uma droga oral na qual possui excelente potencial para terapia de MCR como *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (Wallace, Brown-Elliott et al. 2001; Cavusoglu, Soyler et al. 2007).

A resistência às oxazolidinonas em MCR é usualmente mediada por mutação pontual no rRNA 23S (G2447T genoma de *Escherichia coli*), mas a mutação G2576U confere redução da sensibilidade (Long, Munck et al. 2010). Há outro mecanismo ainda não elucidado, provavelmente mediado por um transportador (Sander, Belova et al. 2002).

### 1.4.3 Tetraciclinas e glicilciclinas

A resistência a tetraciclinas 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). As espécies do grupo *M. chelonae-abscessus* são usualmente resistentes à doxiciclina (Brown-Elliott and Wallace 2002), mas essa resistência não é mediada pelos sistemas de efluxo já conhecidos, a exemplo de LfrA e Tap (Esteban, Martin-de-Hijas et al. 2009). Uma das possibilidades é que essa resistência seja devida à expressão de transportadores da família ABC, cujos genes estão presentes no cromossomo de *M. abscessus* (Ripoll, Pasek et al. 2009), mas considerando a localização plasmidial em *M. smegmatis* e *M. fortuitum,* não é possível excluir a possibilidade de que outros determinantes genéticos ainda não caracterizados possam estar presentes nas espécies do grupo *M. chelonae-abscessus*, pois a mesma publicação que descreve os genes do sistema ABC no cromossomo de *M. abscessus* relata a presença de elementos genéticos ainda não observados em outras espécies de micobactérias, mas sim em *P. aeruginosa* e *B. cepacia* (Ripoll, Pasek et al. 2009).

### 1.4.4 Fluorquinolonas

As fluorquinolonas são agentes antimicrobianos sintéticos, bactericidas que inibem as topoisomerases bacterianas. Da perspectiva estrutural, quinolonas são heterocíclicas com uma estrutura de anel bicíclico, um grupo carboxil na posição 3 e um grupo ceto na posição 4 (Figura 1) (Amato-Neto, Nicodemo *et al.*, 2007).

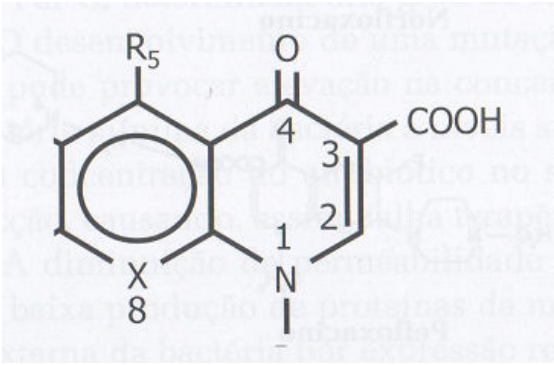



**Figura 1** – Estrutura básica das quinolonas. Fonte: (Amato-Neto, Nicodemo et al. 2007).

As fluorquinolonas são ativas contra ampla gama de patógenos Gram-negativos e Gram-positivos e apresentam boa absorção oral e distribuição sistêmica. Por isso, aplicações clínicas para estes compostos têm sido estendidas para o tratamento de infecções do trato respiratório inferior, infecções de pele e tecidos moles, doenças sexualmente transmissíveis, infecções do trato urinário, osteomielites, infecções entéricas, e como profilaxia em pacientes neutropênicos, cirurgias ou para prevenção espontânea de peritonites bacterianas em pacientes cirróticos, entre outros (Fabrega, Madurga et al. 2009).

Para que a replicação do DNA ocorra, há o envolvimento de diversas enzimas neste processo, como a DNA-helicase que desenrola a dupla fita de DNA antes que a DNA-polimerase comece a sintetizar a nova molécula de DNA. Porém, a ação destas enzimas resulta na formação de superespirais no DNA, que poderão impossibilitar a replicação caso este erro não seja corrigido (Champoux 2001). As topoisomerases removem a superespiralização positiva do DNA e separam as fitas

para que a replicação ocorra, porém sua ação necessita da formação de uma ligação fosfodiéster transitória entre um resíduo de tirosina na proteína e uma das extremidades da fita clivada (Champoux 2001). A maioria das bactérias apresenta diversas topoisomerases, como por exemplo, as topoisomerases I e III (tipo I) que clivam apenas uma fita, ao contrário das topoisomerases II e IV (tipo II) que clivam ambas fitas de DNA (Champoux 2001). A DNA girase é uma enzima que utiliza energia da hidrólise do ATP para introduzir superespiralização negativa no DNA (Figura 2). Esta superespiralização negativa no DNA é essencial para a replicação do DNA e transcrição gênica pela RNA polimerase (Champoux 2001).

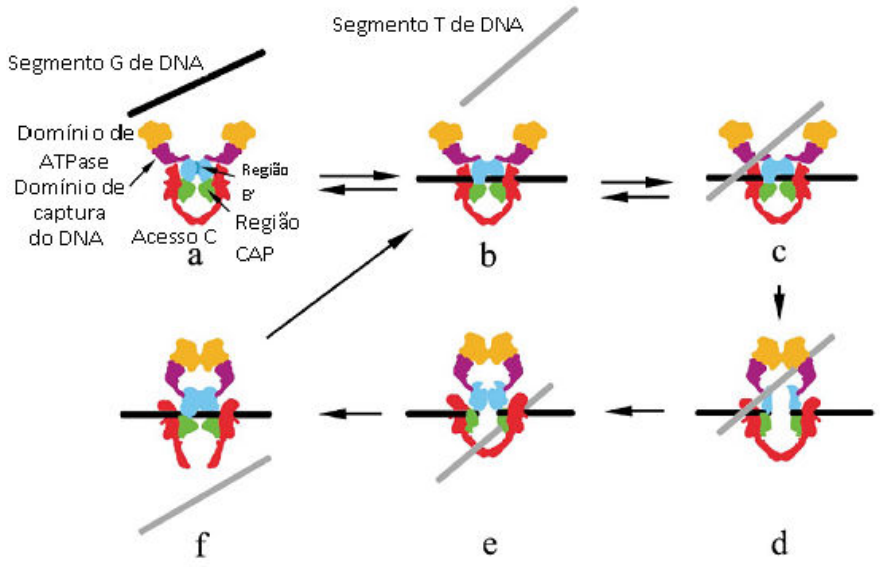



**Figura 2** – Mecanismo de ação das topoisomerases do tipo II. Fonte: Adaptado de Champoux, 2001.

As fluorquinolonas inibem a síntese de DNA visando duas essenciais topoisomerases tipo II, DNA girase e topoisomerase IV. Embora ambas as enzimas mostrem um alto grau de homologia, elas diferem quanto à sua ação durante a replicação do DNA (Champoux 2001).

Como resultado da formação do complexo DNA-topoisomerase-quinolona, ocorre o bloqueio do reparo das quebras nas fitas de DNA geradas pelas topoisomerases, e bloqueio das forquilhas de replicação, inibindo a síntese de DNA,

e consequente bacteriostase e morte celular (Figura 3) (Kohanski, Dwyer et al. 2010).

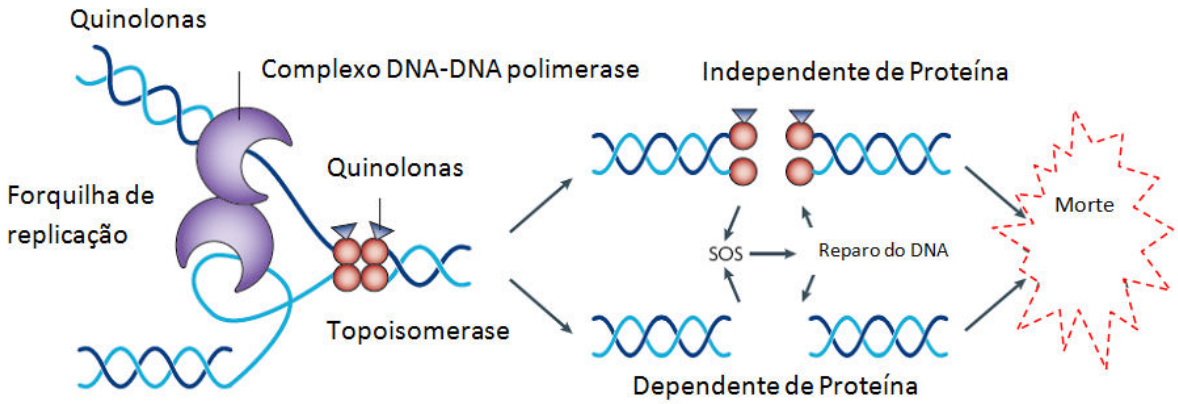



**Figura 3** – Esquema do mecanismo de ação dos antimicrobianos da classe quinolona. Modificado de Kohanski, Dwyer & Collins, 2010.

A DNA girase é um tetrâmero com quatro subunidades, duas de subunidade A (97 KDa) e duas de subunidade B (90 KDa). A subunidade A é codificada pelo gene *gyrA* e está envolvida na quebra e união das fitas de DNA, enquanto a subunidade B é codificada pelo gene *gyrB* e apresenta atividade de ATPase. Mutações que levam à resistência às fluorquinolonas ocorrem na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR), que compreende os resíduos de aminoácidos Ala67 a Gln106 em GyrA e Asp426 a Lys447 em GyrB (Guillemin, Cambau et al. 1995).

A topoisomerase IV também é uma enzima tetramérica que consiste de duas subunidades ParC e duas ParE e possui duas funções na célula: serve como uma enzima que interliga fragmentos de cromossomos após a replicação do DNA e, relaxa a superespiralização positiva (Champoux 2001); entretanto não estão presentes em micobactérias.

Os alvos preferenciais das fluorquinolonas são diferentes em microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos. Para bactérias Gram-negativas é a DNA girase, enquanto para Gram-positivas é a topoisomerase IV (Kohanski, Dwyer et al. 2010); entretanto alguns microrganismos como as micobactérias não possuem

topoisomerase IV. É provável que a DNA girase tenha maior atividade e, provavelmente, assuma o papel da topoisomerase IV em micobactérias, como já demonstrado em *M. smegmatis* (Fabrega, Madurga et al. 2009).

O resíduo Asp-87 da GyrA é fundamental pois interage com o nitrogênio das fluorquinolonas. Além disso, Arg-121, localizada ao lado da tirosina ativa, parece ser outro ponto relevante de ligação (Fabrega, Madurga et al. 2009).

A resistência às fluorquinolonas em MCR pode ser mediada por efluxo (Liu, Takiff et al. 1996; Bellinzoni, Buroni et al. 2009), mutações na subunidade A da girase (Guillemin, Cambau et al. 1995), acetilação ou nitrosilação (Adjei, Heinze et al. 2007). Há relatos de resistência a fluorquinolonas em MCR no Brasil, em clones de *M. chelonae* e *M. abscessus*, 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).

Em *M. smegmatis*, mutações afetando a subunidade A da girase (especialmente mutações nos códons 83 e 87) e associadas com resistência adquirida a quinolonas tem sido descritas, permitindo-nos definir a região QRDR na DNA girase para micobactérias (Guillemin, Cambau et al. 1995).

Recentemente tem sido evidenciado o papel das substituições em GyrB na resistência às fluorquinolonas em *M. tuberculosis*. Sabidamente as substituições D500A e N538T na região QRDR estão implicadas na resistência a fluorquinolonas, mas duas outras substituições (T539P e E540V) fora da região QRDR também estão relacionadas à resistência às fluorquinolonas (Pantel, Petrella et al. 2012). A presença dessas substituições ainda não está demonstrada em MCR.

### 1.4.5 Macrolídeos

Essa classe de antimicrobianos bacteriostáticos atua na subunidade ribossômica 50S inibindo a síntese proteica. É altamente ativo contra muitas

espécies de MNT. Na prática médica os macrolídeos mais utilizados são: claritromicina e azitromicina. Alguns autores consideram a azitromicina um azalídeo. A claritromicina tem sido crescentemente empregada no tratamento das micobacterioses em pacientes HIV soropositivos, e é indicada em associação com etambutol e rifabutina. Já em infecções por outras micobactérias (*M. abscessus* e *M. chelonae*), a claritromicina é a terapêutica de escolha, sempre em associação com um ou dois antimicrobianos (Griffith, Aksamit et al. 2007).

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 esse 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 et al. 2009). Recentemente foi demonstrado o papel dos sistemas de efluxo na resistência a macrolídeos em *M. avium; e*sses 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).

A observação de resistência adquirida a claritromicina em *M. abscessus* foi associada com mutações pontuais na região do gene *rrl*, que codifica o domínio peptidiltransferase para o 23S rRNA e, com o gene *erm*(41), um gene de metilase ribossômica (Bastian, Veziris et al. 2010).

Nash e colabradores (2009) mostraram que embora um isolado possa parecer sensível após três dias de incubação *in vitro*, se a incubação for estendida para 14 dias ou se o isolado for pré-incubado com claritromicina há indução da síntese de uma metiltransferase, e consequentemente resistência à claritromicina. O gene *erm*

é frequentemente envolvido na resistência a macrolídeos em patógenos humanos com mutação no gene 23S rRNA e atua metilando o nucleotídeo A2058 e/ou nucleotídeos vizinhos (A2057 e A2059) no 23S rRNA. Cerca de 12 genes *erm* já foram identificados no gênero *Mycobacterium* [*erm*(37), *erm*(38), *erm*(39), *erm*(40), *erm*(41) e *erm*(42)]. Recentemente, oito tipos de *erm*(41) foram reportados em *M. abscessus* (Vester and Douthwaite 2001; Brown-Elliott, Nash et al. 2012).

A PCR para o gene *erm*(41), descrita por Kim e colaboradores (2010), tem sido proposta como um método simples para diferenciação entre "*M. massiliense"*, *M. abscessus* e "*M. chelonae"*, pois verificou-se uma deleção de aproximadamente 276 pb em todos os isolados pertencentes à espécie "*M. massiliense"* (Kim, Kim et al. 2010).

Buscando-se a sequência de referência do gene *erm*(41) no GenBank, verificamos a existência de oito sequências peptídicas diferentes, com a mesma nomenclatura. Para facilitar a análise de nossos resultados, designamos os depósitos com sufixos de A a F e sugerimos a adequação da designação, pois em resistência antimicrobiana a substituição de um aminoácido, indica uma nova enzima. O depósito EU872495.1 continua com sua nomenclatura original – *erm*(41); já os depósitos EU177504.2, EU590124.1, EU590125.1, EU590126.1, EU590127.1 e EU590129.1 receberam os seguintes nomes: *erm*(41)A, *erm*(41)B, *erm*(41)C, *erm*(41)D, *erm*(41)E e *erm*(41)F, respectivamente, a partir da ordem dos depósitos no GenBank. Quanto ao depósito EU590128.1, descrito em *M. abscessus* por Nash e colaboradores em 2009, foi observada uma deleção no gene *erm*(41), apenas presente em isolados de *M. massiliense*. Kim *et al.* (2010) concluiu que as características observadas neste depósito do GenBank não correspondiam às identificadas em seu estudo, renomeando este depósito para *erm*(42) – FJ358488 (Kim, Kim et al. 2010).

## 1.5 Resistência antimicrobiana e genes de localização plasmidial

O papel da expressão de genes de localização plasmidial no fenótipo de resistência em micobactérias ainda é incerto, e poucos estudos têm buscado esta correlação (Hull, Wallace et al. 1984), apesar de a sua presença, particularmente em *M. fortuitum* e *M. abscessus* já ter sido descrita por alguns autores (Wallace, Steele et al. 1984; Wallace, Musser et al. 1989).

Análises comparativas de genomas bacterianos sugerem que a transferência horizontal de genes plasmidiais tem um papel importante na evolução adaptativa à presença de antimicrobianos (Gogarten, Doolittle et al. 2002; Jain, Rivera et al. 2002; Gogarten and Townsend 2005). Esses plasmídios codificam características relacionadas ao controle de replicação e funções conjugativas e possuem genes acessórios, tais como genes de resistência a antibióticos ou resistência a metais pesados (Slater, Bailey et al. 2008). Além da conjugação e replicação, a estabilidade na ausência de seleção para características codificadas por plasmídios é o terceiro fator que deveria ser considerado na avaliação em longo prazo da ampla gama de hospedeiros plasmidiais (Smets and Barkay 2005).

Os plasmídios muitas vezes albergam transposons e ou integrons. Particularmente os integrons são capazes de incorporar cassetes gênicos e expressá-los sob controle de um único promotor forte. Os transposons, como sugere a nomenclatura, por codificarem transposases, são capazes de se auto-transferir para diferentes regiões dos plasmídeo, de um plasmídeo para o cromossomo bacteriano e vice-versa. Essas estruturas são, portanto, importantes na evolução bacteriana e na adaptação a mudanças ambientais, porque podem albergar genes que codificam vantagens adaptativas para o hospedeiro (Slater, Bailey et al. 2008; Norberg, Bergstrom et al. 2011).

Os plasmídeos podem ser subdivididos em grupos de incompatibilidade (Inc). Plasmídeos com o mesmo controle de replicação são “incompatíveis”, enquanto plasmídeos com diferentes controles são “compatíveis”. Assim, dois plasmídeos de mesmo grupo Inc não se propagam simultaneamente na mesma linhagem bacteriana. A definição do grupo de incompatibilidade tradicionalmente era realizada

por meio da introdução, por conjugação ou transformação, de um plasmídeo cujo grupo Inc é “desconhecido” em uma cepa que transporta um plasmídeo com grupo Inc conhecido (Carattoli, Bertini et al. 2005). Atualmente há o conhecimento de estruturas únicas de cada grupo de incompatibilidade, a classificação é realizada por PCR e sequenciamento de DNA. Os plasmídios pertencentes ao grupo IncP-1 são vistos como sendo os plasmídios mais promíscuos atualmente. Eles podem se transferir e se replicar em uma ampla variedade de gêneros distintos filogeneticamente. Essa propriedade é exibida em poucos outros grupos, como IncC, IncN, IncQ e IncW (Thomas and Smith 1987; Krishnapillai 1988). Uma das características que permite a estabilidade dos plasmídios IncP em seus hospedeiros é a expressão de sistema toxina-atitoxina. Usualmente esses sistemas são compostos por duas proteínas, uma toxina e uma protease que a degrada. Como a toxina tem maior estabilidade do que a protease, caso a célula filha perca o plasmídio a toxina consegue atuar e matar a bactéria sem plasmídio (Yamaguchi, Park et al. 2011). O sistema RelERelB (RelEDinJ) está presente no plasmídio pBRA-100 (GenBank CP003505), do grupo de incompatibilidade P-1 em isolados pertencentes ao clone “*M. massiliense*“ BRA-100, o que indica a transferência de material genético entre gêneros não correlatos: *Mycobacterium* e *Pseudomonas* (Sampaio, Mandelbaum et al. 2009). A mesma cepa com plasmídeo foi detectada em diferentes estados brasileiros, o que aponta a necessidade de avaliarmos a presença desse e outros plasmídeos IncP em isolados das diferentes espécies de MCR no Brasil.

# 2 JUSTIFICATIVA

Há um número reduzido de publicações no PubMed sobre mecanismos de resistência antimicrobiana, sobre transferência de material genético ou sobre a relação entre genes plasmidiais e perfil de susceptibilidade em MCR, sejam internacionais ou nacionais. O entendimento dos mecanismos de resistência poderá contribuir para o delineamento de novas estratégias de terapia antimicrobiana.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os determinantes da resistência aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por micobactérias de crescimento rápido e avaliar a capacidade de conjugação e estabilidade de plasmídios do grupo IncP.

## 3.2 Objetivos Específicos

→ Avaliar a ocorrência de substituições na região QRDR de *gyrA* e *gyrB* e sua correlação com a elevação de CIMs para fluorquinolonas;
→ Avaliar a correlação entre a presença de genes que codificam RNA-metilases e resistência a macrolídeos;
→ Avaliar a presença de iterons de plasmídios IncP em diferentes espécies de MCR;
→ Avaliar a clonalidade de isolados que contenham plasmídios do grupo IncP;
→ Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados através de painel comercial RAPMYCO - Sensititre®;
→ Avaliar a capacidade de transferência horizontal por conjugação do plasmídio pBRA-100 para *Escherichia coli* J53 resistente à azida sódica;
→ Avaliar a estabilidade do plasmídio pBRA-100 em *Escherichia coli*.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Isolados Bacterianos

Neste estudo foram utilizadas micobactérias de crescimento rápido (MCR) pertencentes ao banco de micobactérias do Instituto Fleury, cultivadas de diversas amostras de infecções humanas, como feridas cirúrgicas, lavados broncoalveolares, hemoculturas, abscessos cutâneos. Foram selecionados preferencialmente os isolados com algum perfil de resistência aos antimicrobianos rotineiramente utilizados no tratamento das infecções por MCR.

As espécies bacterianas foram previamente identificadas pelo sequenciamento parcial do gene *rpoB*, conforme descrito por (Adekambi, Colson et al. 2003).

Para a realização da metodologia deste trabalho as amostras foram descongeladas, repicadas em ágar Middlebrook 7H10 ou ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas a 30°C ± 1°C por 3 a 7 dias. As culturas foram avaliadas quanto à pureza e fenótipo colonial. Uma alíquota foi congelada em caldo TSB contendo 10% glicerol a -80°C.

Para cada metodologia foram utilizados diferentes isolados bacterianos, conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** – Isolados utilizados neste estudo

| Metodologia | N° de isolados clínicos de: | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***M. abscessus* subsp. *abscessus*** | ***M. abscessus* subsp. *bolletii*** | ***M. fortuitum*** | **Outras espécies de micobactérias** |
| Sequenciamento parcial do gene gyrA | 24 | 25 | 20 | - |
| Sequenciamento parcial do gene gyrB | 23 | 25 | 20 | - |
| Sequenciamento integral do gene erm | 20 | 19 | 20 | - |
| Microdiluição em caldo | 85 | 26 | 20 | - |
| Sequenciamento de íterons de plasmídios IncP | 23 | 40 | 22 | 40 |
| ERIC-PCR | - | 14 | - | - |

## 4.2 Extração de DNA por lise térmica

Os lisados foram preparados a partir de crescimento bacteriano obtido em ágar Middlebrook 7H10, após cinco dias de incubação a 30°C ± 1°C. As suspensões bacterianas foram preparadas em 100 µL de água grau reagente estéril, de modo a atingir uma turbidez equivalente à escala 3 de McFarland. A seguir foram fervidas por 20 minutos e congeladas a -20°C por 20 minutos. Para amplificação dos genes de resistência, os lisados foram descongelados à temperatura ambiente, homogeneizados e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram mantidos a -80°C até a utilização para as diferentes reações de PCR.

## 4.3 Amplificação para sequenciamento parcial de genes determinantes de resistência à fluorquinolonas

O DNA extraído das amostras foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões determinantes de resistência a fluorquinolonas (genes *gyrA* e *gyrB*).

Os oligonucleotídeos utilizados para estas amplificações foram desenhados com auxílio do programa Primer-BLAST utilizando como referência o genoma de *M. abscessus* (GenBank NC_010397.1). As reações de PCR foram preparadas com as seguintes concentrações de reagentes: Tampão GC 1x; 200µM dNTP; 0,16µM de cada primer; 0,5U Taq Phusion (Thermo-Finnzymes), uma enzima de alta fidelidade utilizada em função da necessidade de se avaliar mutações pontuais. As sequências dos oligonucleotídeos e as condições da amplificação estão descritas na Tabela 3.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando como referência a escala 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida, foram corados com Gel Red® (Uniscience) e visualizados em transiluminador UV. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para o sequenciamento dos amplicons. Os amplicons foram purificados utilizando-se o kit

GFX (GE Life Science) e a seguir foram enviados para o Centro de Estudos do Genoma Humano para sequenciamento.

Os contigs foram montados utilizando-se o programa DNA Baser Sequence Assembler versão 3.5.3 (Heracle Biosoft) e a seguir alinhados no BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999).

## 4.4 Amplificação para sequenciamento integral de genes determinantes de resistência à macrolídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para estas amplificações foram desenhados com auxílio do programa Primer-BLAST e alinhados com sequências de referência depositadas no GenBank.

As amplificações para os genes *erm* contaram com duas condições distintas:

1. Para a PCR contendo o par de primers "RNAmet" (Tabela 3), utilizou-se Tampão 1x; 1,5mM $MgCl_2$; 200µM dNTP; 0,2µM de cada primer; 0,4U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen);
2. Para as demais amplificações especificadas na Tabela 3 para os genes *erm* utilizou-se Tampão GC 1x; 200µM dNTP; 0,16µM de cada primer; 0,5U Taq Phusion (Thermo-Finnzymes).

As sequências dos oligonucleotídeos e as condições da reação estão descritas na Tabela 3. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida, foram corados com Gel Red® (Uniscience) e visualizados em transiluminador UV. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para o sequenciamento dos amplicons.

Os contigs foram montados utilizando-se o programa DNA Baser Sequence Assembler versão 3.5.3 (Heracle Biosoft) e a seguir alinhados no BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). As sequências de aminoácidos foram comparadas

aquelas das cepas de referência depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLAST.

## 4.5 Detecção e sequenciamento da região de íterons de plasmídios IncP

O DNA extraído por lise térmica serviu como molde na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de regiões de íteron de plasmídios IncP. As amplificações contaram com as seguintes condições: Tampão GC 1x; 200µM dNTP; 0,16µM de cada primer; 0,5U Taq Phusion (Thermo-Finnzymes). As sequências dos oligonucleotídeos e as condições da reação estão descritas na Tabela 3. A cepa *M. abscessus* F1725, da qual originalmente foi isolado o plasmídio pBRA-100, foi utilizada como controle positivo em todos os lotes de reações.

Os oligonucleotídeos utilizados para estas amplificações foram desenhados com auxílio do programa Primer-BLAST e alinhados com sequências de plasmídios IncP depositadas no GenBank, incluindo aquela do plasmídio pBRA-100 (CP003505.2). Houve necessidade de desenho desses oligonucleotídeos, pois a sequência dos oligonucleotídeos propostos por (Carattoli, Bertini et al. 2005) não anela adequadamente com nenhum dos plasmídeos IncP cujas sequências estão disponíveis no GenBank.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se como referência a escala 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida, foram corados com Gel Red® (Uniscience) e visualizados em transiluminador UV. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para o sequenciamento dos amplicons.

Os contigs foram montados utilizando-se o programa DNA Baser Sequence Assembler versão 3.5.3 (Heracle Biosoft) e a seguir alinhados no BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). As sequências de nucleotídeos foram comparadas com aquela do depósito (GenBank CP003505.2) do plasmídio pBRA-100 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolleti*i F1725.

**Tabela 3 –** Iniciadores e condições utilizados nos ensaios de PCR.

| Gene | Sequência do primer 5'-3' | Tamanho do fragmento | Ciclo de Amplificação | Alvo | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| gyrA-FW-62-83<br>gyrA-RV-566-585 | ACATYSAGCAGGAGATGCAGCG*<br>GTTGTGCGGCGGSATRTTGG* | 524 bp | 98°C – 30s;<br>35X: 98°C – 10s, 62°C – 20s, 72°C – 30s;<br>72°C – 7 min. | *gyrA* | Este trabalho |
| gyrB-FW-1016-1035<br>gyrB-RV-1714-1694 | CGGTGCACACSTTYGCCAAC*<br>CRTCGGCCATCARCACGATCT* | 699 bp | 98°C – 30s;<br>35X: 98°C – 10s, 67°C – 20s, 72°C – 30s;<br>72°C – 7 min. | *gyrB* | Este trabalho |
| RNAmet-FW<br>RNAmet-RV | GCCGGCAYGAGWWCGGCCAG*<br>TCGAACCACGGCCACCACTG | 460 bp | 94°C – 2 min.;<br>35X: 94°C – 30s, 62°C – 30s, 72°C – 30s;<br>72°C – 7 min. | *erm* de *M. fortuitum* | Este trabalho |
| erm41-rpsA-5L<br>erm41-coaE-3L | CTTTGGAGCATGGGCATATT<br>GTTAGGCCGATACGCAACAT | 650 bp | 98°C – 30s;<br>35X: 98°C – 10s, 66°C – 20s, 72°C – 30s;<br>72°C – 7 min. | *erm* de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *bolletii* | Este trabalho |
| erm(39)-FW-28-45<br>erm(39)-RV-676-658 | GAGAACGGCCAGAATTTT<br>GGTGAATTCCGTTGGCAGA | 648 bp | 98°C – 30s;<br>35X: 98°C – 10s, 58°C – 20s, 72°C – 30s;<br>72°C – 7 min. | *erm* de *M. fortuitum* | Este trabalho |
| IncP-JS-FW<br>IncP-JS-RV | CCTGGCTCTCCTAAGCCGYA*<br>AGCGTATTGACACATGGGGG | 356 bp | 98°C – 30s;<br>35X: 98°C – 10s, 62°C – 20s, 72°C – 30s;<br>72°C – 7 min. | IncP | Este trabalho |

*Y=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; W=A ou T.

## 4.6 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensuns (ERIC-PCR)

Um total de 13 isolados positivos para plasmídios IncP foram analisadas pela técnica de PCR utilizando-se os primers ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' e ERIC2 5´-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3'(Sampaio, Viana-Niero et al. 2006; Aydin, Gümüssoy et al. 2007).

Para montagem das reações utilizou-se tampão 1x com KCl, 3mM de $MgCl_2$, 120µM dNTP; 0,5µM de cada primer; 1,25U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific).

A reação de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94$^{o}$C por 10 minutos seguida de etapa de amplificação com 35 ciclos constituída de uma etapa de desnaturação a 94$^{o}$C de 1 minuto, anelamento a 52$^{o}$C por 1 minuto e etapa de extensão a 72$^{o}$C por 3 minutos. Por fim, uma extensão final a 72$^{o}$C por 16 minutos. A separação dos fragmentos foi obtida por eletroforese em gel de agarose a 1,5% que a seguir foi corado com Gel Red® (Uniscience) para posterior visualização em transiluminador de luz UV.

Para cálculo da similaridade a partir dos perfis de amplificação foi utilizado o coeficiente de Pearson com 1% de tolerância e otimização e o programa Bionumerics (Applied Matths NV, Sint-Martens-Latem, Bélgium). Foram considerados não pertencentes a um mesmo clone isolados com similaridade inferior a 92% entre seus perfis (Sampaio, Viana-Niero et al. 2006).

## 4.7 Microdiluição em caldo

A metodologia de microdiluição em caldo foi realizada utilizando-se placas Sensititre® RAPMYCO - TREK Diagnostic Systems (Figura 4) para verificação da concentração inibitória mínima de 81 isolados clínicos pertencentes à espécie *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 23 da espécie *M. abscessus* subsp. *bolletii* e 20 da espécie *M. fortuitum*. As cepas de referência *S. aureus* ATCC 29213 e *M. peregrinum* ATCC 700686 foram utilizadas como cepas de referência.

Os testes foram realizados conforme instruções do fabricante. Foram preparadas suspensões bacterianas em água Milli-Q estéril com turbidez equivalente a 0.5 na escala de MacFarland (625nm – 0,08 a 0,1A). Foram transferidos 50 µL dessa suspensão para o tubo com caldo Mueller Hinton cátion ajustado do mesmo fabricante da placa. A suspensão foi homogeneizada por movimentos de inversão, foi transferida para placa de Petri estéril e a seguir foram inoculados 100 µL em cada poço da placa utilizando-se pipeta automática multicanal. As placas foram seladas para manter a umidade e a seguir foram incubadas a 30°C ± 1°C por 72 horas antes da primeira leitura e por 14 dias para a segunda leitura.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | SXT 0.25/4.75 | SXT 0.5/9.5 | SXT 1/19 | SXT 2/38 | SXT 4/76 | SXT 8/152 | LZD 1 | LZD 2 | LZD 4 | LZD 8 | LZD 16 | LZD 32 |
| B | CIP 0.12 | CIP 0.25 | CIP 0.5 | CIP 1 | CIP 2 | CIP 4 | IMI 2 | IMI 4 | IMI 8 | IMI 16 | IMI 32 | IMI 64 |
| C | MXF 0.25 | MXF 0.5 | MXF 1 | MXF 2 | MXF 4 | MXF 8 | FEP 1 | FEP 2 | FEP 4 | FEP 8 | FEP 16 | FEP 32 |
| D | FOX 4 | FOX 8 | FOX 16 | FOX 32 | FOX 64 | FOX 128 | AUG2 2/1 | AUG2 4/2 | AUG2 8/4 | AUG2 16/8 | AUG2 32/16 | AUG2 64/32 |
| E | AMI 1 | AMI 2 | AMI 4 | AMI 8 | AMI 16 | AMI 32 | AMI 64 | AXO 4 | AXO 8 | AXO 16 | AXO 32 | AXO 64 |
| F | DOX 0.12 | DOX 0.25 | DOX 0.5 | DOX 1 | DOX 2 | DOX 4 | DOX 8 | DOX 16 | MIN 1 | MIN 2 | MIN 4 | MIN 8 |
| G | TGC 0.015 | TGC 0.03 | TGC 0.06 | TGC 0.12 | TGC 0.25 | TGC 0.5 | TGC 1 | TGC 2 | TGC 4 | TOB 1 | TOB 2 | TOB 4 |
| H | CLA 0.06 | CLA 0.12 | CLA 0.25 | CLA 0.5 | CLA 1 | CLA 2 | CLA 4 | CLA 8 | CLA 16 | TOB 8 | TOB 16 | POS |

**Figura 4** – Modelo de placa Sensititre® RAPMYCO (TREK Diagnostic Systems) para microdiluição em caldo. Antimicrobianos: SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; LZD – linezolida; CIP – ciprofloxacina; IMI – imipenem; MXF – moxifloxacina; FEP – cefepima; FOX – cefoxitina; AUG2 – amoxicilina/ácido clavulânico; AMI – amicacina; AXO – ceftriaxona; DOX – doxiciclina; MIN – minociclina; TGC – tigeciclina; TOB – tobramicina; CLA – claritromicina; POS – controle positivo.

## 4.8 Extração DNA plasmidial enterobactérias

A cepa denominada TOP MYCO, *E. coli* TOP10 contendo o plasmídio pBRA-100 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* foi utilizada nos ensaios de

conjugação e estabilidade plasmidial. Para verificação da integridade deste plasmídio, os isolados foram cultivados em ágar Mueller-Hinton e incubados a 36°C ± 1°C por 18 a 24 horas. Colônias isoladas foram transferidas para tubo contendo 5 mL de caldo Mueller-Hinton e incubadas a 36°C ± 1°C overnight. Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o método de lise alcalina descrito por Birnboim & Doly (Birnboim and Doly 1979) com modificações descritas por Sambrook e Russell (Sambrook and Russell 2001). Uma alíquota de 1,5 mL de cultura foi submetida à centrifugação de 16000 x g por 30 seg. a 4°C, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspenso em 100 µL de solução I (20mg/mL lisozima, 50mM glicose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl – pH 8,0). Adicionou-se 200 µL de solução II (0,2N NaOH, 1% SDS) e homogeneizou-se por inversão. Após 5 min de incubação em gelo picado , 150 µL de solução III mantida em gelo picado (3M acetato de sódio – pH 4,8) foram adicionados e o tubo foi homogeneizado por inversão para precipitação do DNA cromossômico. Incubou-se a 0°C por 5 min, centrifugou-se a 16000 x g por 5 min a 4°C e transferiu-se 250 µL do sobrenadante para um novo microtubo, onde o DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado. Após uma incubação a -20°C ± 1°C por 30 min, o precipitado foi coletado por centrifugação a 16000 x g por 2 min a 4°C. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 100 µL de solução IV gelada (0,1M acetato de sódio/ 0,05M Tris-HCl - pH 8,0) e o DNA precipitado com 200µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi incubado a -20°C ± 1°C por 10 min para o DNA plasmidial ser coletado por centrifugação. O sedimento foi suspendido em 36 µL de TE buffer e 4 µL de RNAse (1mg/mL) e incubado a 36°C ± 1°C por 30 min. A concentração de DNA plasmidial foi quantificada utilizando-se o Nanodrop. As extrações foram armazenadas a -80°C até utilização.

## 4.9 Diluição em ágar

Para os ensaios de conjugação e estabilidade plasmidial foi necessária a realização de diluição em ágar para conhecimento da concentração inibitória mínima (CIM) das cepas *Escherichia coli* TOP MYCO, *Escherichia coli* J53 (Jacoby and Han

1996), *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* ("*M. massiliense*") F1660 em relação aos antimicrobianos kanamicina, azida sódica e ciprofloxacina. A cepa F1660 tem perfil de PFGE que difere apenas pela presença do plasmídio em relação à cepa F1725.

Foram preparadas placas de ágar LB, em duplicata, contendo diferentes concentrações de kanamicina. Foram preparadas suspensões bacterianas com turbidez equivalente a escala 0.5 de MacFarland (0,08 a 0,1 de absorbância no comprimento de onda de 625 nm), e transferiu-se 100 µL para tubo contendo 9,9 mL de água Milli-Q estéril. Em seguida, 300 µL das suspensões bacterianas diluídas foram adicionadas a cada poço do inoculador de Steers, sendo seu carimbo posicionado sob as placas, da menor para a maior concentração, para inoculação.

Após incubação de 24 h a 36°C ± 1°C no caso de enterobactérias ou 72 h a 30°C ± 1°C para micobactérias, observou-se em qual concentração do antimicrobiano havia inibição total do crescimento bacteriano.

## 4.10 Ensaio de conjugação

Os ensaios de conjugação foram baseados nas descrições de Hardy, 1986 e Miller, 1992 (Hardy 1986; Miller 1992).

### 4.10.1 Enterobactérias

As cepas *Escherichia coli* TOP MYCO e *Escherichia coli* J53 foram cultivadas em 10 mL de caldo LB (Luria Broth) a 36°C ± 1°C a 150 rpm até atingir $DO_{600nm}$ de aproximadamente 0.7A. Foram transferidos 5 mL de cada suspensão bacteriana para um Erlenmeyer estéril (50 mL) e estes incubados a 36°C ± 1°C por 18 a 24 h sem agitação.

Foram inoculados 50 µL em cada placa de ágar LB contendo 16 µg/mL de kanamicina e 62,5 µg/mL de azida sódica para isolamento de colônias, sendo que, para verificação da frequência de conjugação, foram preparadas 12 diluições seriadas (1:10) em solução de cloreto de sódio a 0,9% a partir de 1mL da suspensão bacteriana. Foram inoculados 10 µL de cada diluição em placas de ágar LB contendo 16 µg/mL de kanamicina e 62,5 µg/mL de azida sódica e placas de ágar LB contendo apenas 62,5 µg/mL de azida sódica para controle da frequência de conjugação, conforme demonstrado na Figura 5.

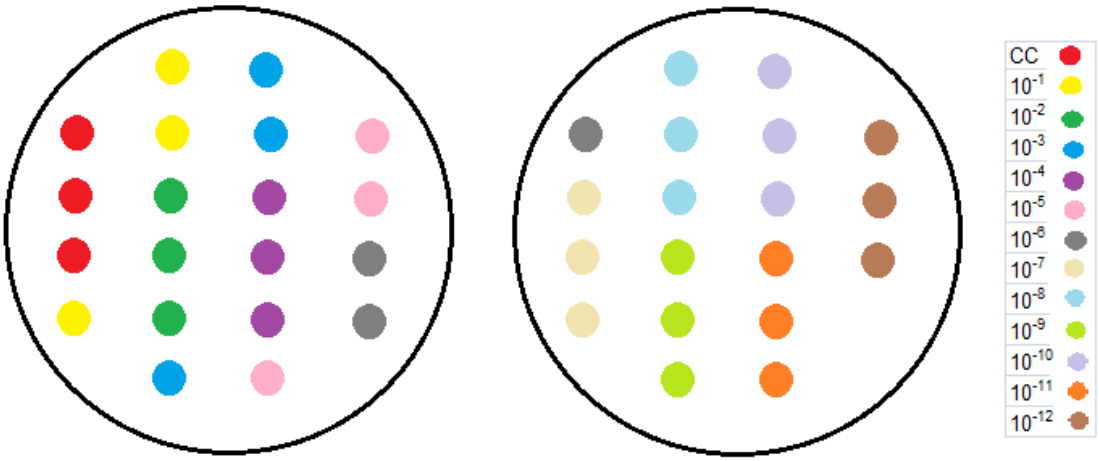



**Figura 5** - Esquema da placa de ágar LB para inoculação da suspensão bacteriana para cálculo da frequência de conjugação.

Foi realizada a contagem das colônias de cada placa, calculou-se a média e multiplicou-se pela potência da diluição e pelo volume semeado nesta (ajustado para 1mL). Enfim, calculou-se a frequência de conjugação dividindo o total de UFC/mL da conjugação pela UFC/mL do controle da frequência de conjugação.

### 4.10.2 Micobactérias

A cepa "*M. massiliense*" F1660 foi crescida em 10 mL de caldo LB (Luria Broth) a 30°C ± 1°C a 150 rpm até atingir $DO_{600nm}$ de aproximadamente 1.0A.

Paralelamente, a cepa *Escherichia coli* TOP MYCO foi crescida em 10 mL de caldo LB (Luria Broth) a 36°C ± 1°C a 150 rpm até atingir $DO_{600nm}$ de aproximadamente 0.7A. Transferiu-se 5 mL de cada suspensão bacteriana para um Erlenmeyer estéril (50 mL) e incubou-se a 30°C ± 1°C por 72 h sem agitação.

Foram inoculados 50 µL em cada placa de ágar LB contendo 256 µg/mL de kanamicina e 2 µg/mL de ciprofloxacina para isolamento de colônias, sendo que, para verificação da frequência de conjugação, foram preparadas 12 diluições seriadas (1:10) em solução de cloreto de sódio a 0,9% a partir de 1mL da suspensão bacteriana. Foram inoculados 10 µL de cada diluição em placas de ágar LB contendo 256 µg/mL de kanamicina e 2 µg/mL de ciprofloxacina e placas de ágar LB contendo apenas 2 µg/mL de ciprofloxacina para controle da frequência de conjugação, conforme demonstrado anteriormente na Figura 5.

Foi realizada a contagem das colônias de cada placa, calculou-se a média e multiplicou-se pela potência da diluição e pelo volume semeado nesta (ajustado para 1mL). Enfim, calculou-se a frequência de conjugação dividindo o total de UFC/mL da conjugação pela UFC/mL do controle da frequência de conjugação.

## 4.11 Ensaio de Estabilidade Plasmidial

Os experimentos de estabilidade foram baseados nos ensaios descritos por Gelder e colaboradores (Gelder, Ponciano et al. 2007) com modificações.

A cepa *Escherichia coli* TOP MYCO foi semeada em ágar LB contendo 8 µg/mL de kanamicina e incubada a 36°C ± 1°C por 24 h para isolamento de colônias puras. Sendo o experimento realizado em triplicata, três colônias distintas foram inoculadas em 5 mL de caldo LB contendo 8 µg/mL de kanamicina.

Após incubação por 24 h a 36°C ± 1°C a 200 rpm, 1 mL destas culturas foram lavadas por centrifugação para remoção do antimicrobiano e resuspendidas em 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Foram transferidos 4,88 µL da suspensão bacteriana para 5 mL de caldo LB sem o antimicrobiano, de modo a obter-se aproximadamente 10 gerações após 24 h de incubação a 36°C ± 1°C a 200 rpm (taxa de diluição $1:2^{10}$). Estas culturas constituíram o ponto zero do tempo e foram diluídas (1:10) em 12 alíquotas e plaqueadas em ágar LB com e sem o antimicrobiano para contagem de colônias isoladas (conforme descrito anteriormente na Figura 5).

Paralelamente, 4,88 µL de cada suspensão do tempo zero foi transferido para 5 mL de caldo LB e incubados nas mesmas condições para obtenção do tempo 1, seguindo-se com diluição da suspensão bacteriana e semeadura em placas com e sem kanamicina. Este experimento foi realizado por 57 dias consecutivos, sendo que, para a análise dos resultados realizou-se a razão entre logaritmo decimal (log10) das UFC/mL crescidas em placas com e sem antimicrobiano.

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Determinantes de resistência à fluorquinolonas

### 5.1.1 Análise das sequências de aminoácidos de GyrA

Comparando as sequências de aminoácidos de isolados de *M. fortuitum, M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* sensíveis e resistentes à ciprofloxacino (Figura 6) observamos a presença de um resíduo de serina (aminoácido polar) na região QRDR, posição 83 em *M. fortuitum* sensíveis a este antimicrobiano, porém, em isolados resistentes (F2527 e F2715 – Tabela 4) o resíduo observado é de triptofano (aminoácido apolar). Quando as sequências foram comparadas com aquelas de isolados do Grupo *M. abscessus*, observamos um resíduo de alanina na posição 83, em amostras sensíveis e resistentes à ciprofloxacino (Tabelas 5 e 6).

Na posição 117, notamos a substituição de uma prolina em *M. fortuitum* por uma alanina em amostras do Grupo *M. abscessus*, ambos aminoácidos apolares, independente do perfil de susceptibilidade demonstrado por essas amostras.

Do mesmo modo, observamos que na posição 154 de todos os isolados do Grupo *M. abscessus* há um resíduo de metionina, aminoácido apolar, enquanto em *M. fortuitum* o resíduo é de glutamina, aminoácido polar. Foi realizado o dobramento da proteína GyrA em 3D na posição 154 através do programa PyMol (Figura 7) para melhor visualização de sua conformação, tendo sido observado que há alteração na conformação da proteína em função dessa substituição.

### 5.1.2 Análise das sequências de aminoácidos de GyrB

No alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *gyrB* foram observadas substituições em alguns resíduos de aminoácidos em todas as espécies, porém, não verificamos nenhuma substituição responsável pela resistência à ciprofloxacino ou moxifloxacina.

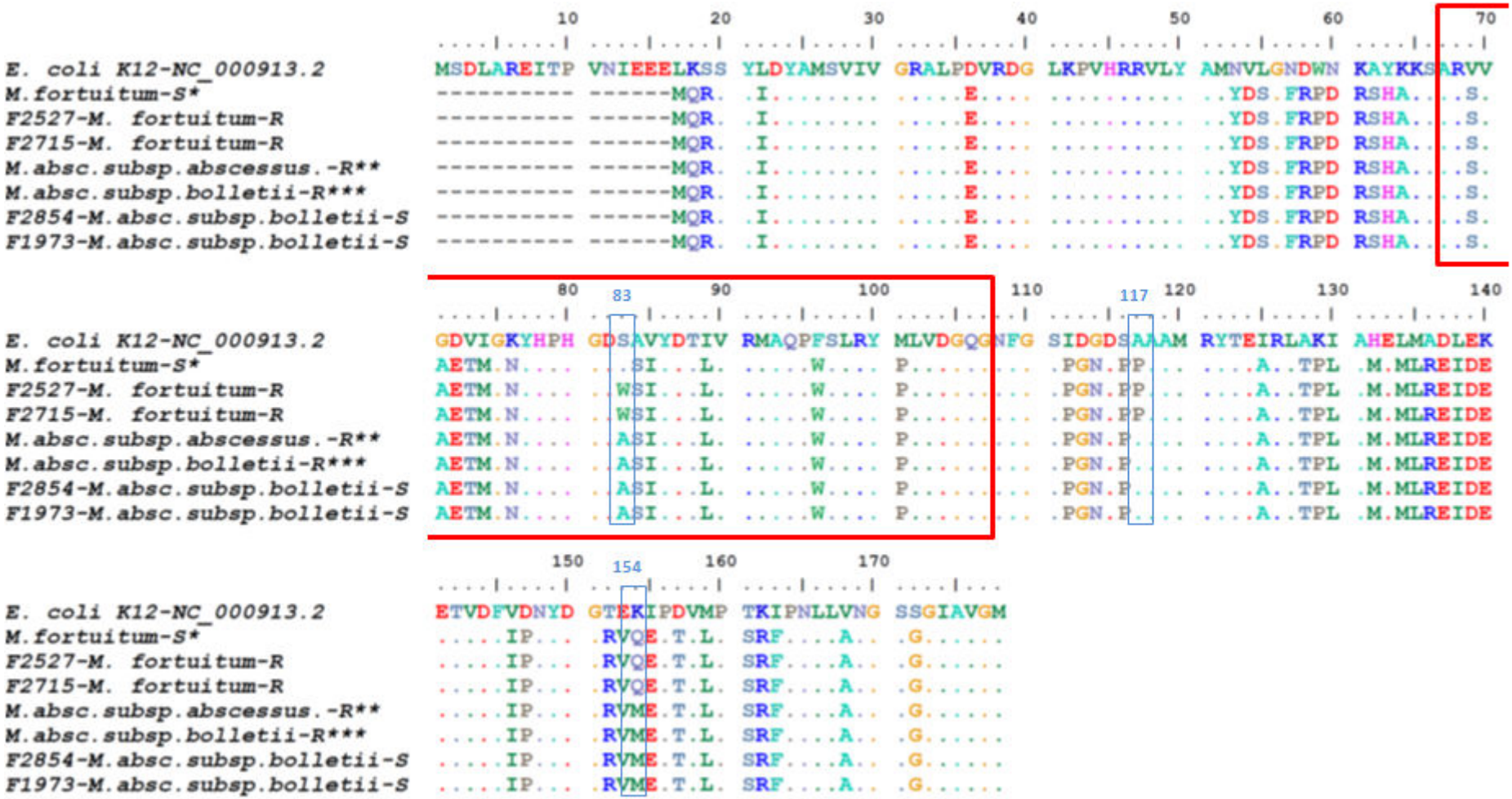



**Figura 6** – Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *gyrA* das espécies *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus, Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* e *Mycobacterium fortuitum.* Em destaque (vermelho), a região QRDR, que compreende os resíduos 67 a 106 dos aminoácidos. Notar as substituições nos aminoácidos 83, 117 e 154 (azul). *Sequência consenso entre os 18 isolados de *M. fortuitum* sensíveis à ciprofloxacino. **Sequência consenso entre os 24 isolados de *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* resistentes à ciprofloxacino. ***Sequência consenso entre os 23 isolados de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* resistentes à ciprofloxacino.

**Tabela 4** – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para ciprofloxacino e moxifloxacina e resíduos de aminoácidos observados nas posições 83, 117 e 154 do sequenciamento parcial do gene *gyrA* dos 20 isolados clínicos de *Mycobacterium fortuitum.* Em destaque (cor azul) observamos as amostras resistentes à ciprofloxacino e moxifloxacina. CIPRO=ciprofloxacino e MOXI=moxifloxacina.

| Isolado clínico | Espécie bacteriana | CIM (µg/mL) | | Resíduo de aminoácido na posição: | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CIPRO | MOXI | 83 | 117 | 154 |
| F2477 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2488 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2491 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2495 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2502 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2527 | *M. fortuitum* | 4 | 2 | W | P | Q |
| F2536 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2577 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2602 | *M. fortuitum* | 0.5 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2613 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2614 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2639 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2680 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2686 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2687 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2715 | *M. fortuitum* | 2 | ≤0.25 | W | P | Q |
| F2717 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2755 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2757 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |
| F2815 | *M. fortuitum* | ≤0.12 | ≤0.25 | S | P | Q |

**Tabela 5** – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para ciprofloxacino e moxifloxacina e resíduos de aminoácidos observados nas posições 83, 117 e 154 do sequenciamento parcial do gene *gyrA* dos 25 isolados clínicos de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii.*Em destaque (cor azul) observamos as amostras resistentes à ciprofloxacino e moxifloxacina. CIPRO=ciprofloxacino e MOXI=moxifloxacina.

| Isolado clínico | Espécie bacteriana | CIM (µg/mL) | | Resíduo de aminoácido na posição: | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CIPRO | MOXI | 83 | 117 | 154 |
| F1759 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F3055 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F3087 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 4 | 2 | A | A | M |
| F2854 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 1 | 0.5 | A | A | M |
| F1464 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1973 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≤0.12 | ≤0.25 | A | A | M |
| F1966 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1958 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1985 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1987 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2002 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2061 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2085 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2105 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2122 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 2 | 4 | A | A | M |
| F2111 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2149 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2209 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2261 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2370 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2369 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2598 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 2 | 2 | A | A | M |
| F2599 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2697 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2795 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |

**Tabela 6** – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para ciprofloxacino e moxifloxacina e resíduos de aminoácidos observados nas posições 83, 117 e 154 do sequenciamento parcial do gene *gyrA* dos 24 isolados clínicos de *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus.* CIPRO=ciprofloxacino e MOXI=moxifloxacina.

| Isolado clínico | Espécie bacteriana | CIM (µg/mL) | | Resíduo de aminoácido na posição: | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CIPRO | MOXI | 83 | 117 | 154 |
| F1228 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1237 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1297 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2988 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1326 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1350 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 4 | ≥8 | A | A | M |
| F2098 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2176 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | 8 | A | A | M |
| F2394 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | 8 | A | A | M |
| F2503 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | 4 | A | A | M |
| F2484 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2523 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2493 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 4 | 4 | A | A | M |
| F2534 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2504 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | 8 | A | A | M |
| F2535 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | 8 | A | A | M |
| F2542 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | 4 | A | A | M |
| F2558 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F2651 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 4 | 8 | A | A | M |
| F2649 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 4 | ≥8 | A | A | M |
| F2650 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥4 | ≥8 | A | A | M |
| F1041 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 4 | 8 | A | A | M |
| F1070 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | 8 | A | A | M |
| F0440 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 4 | ≥8 | A | A | M |

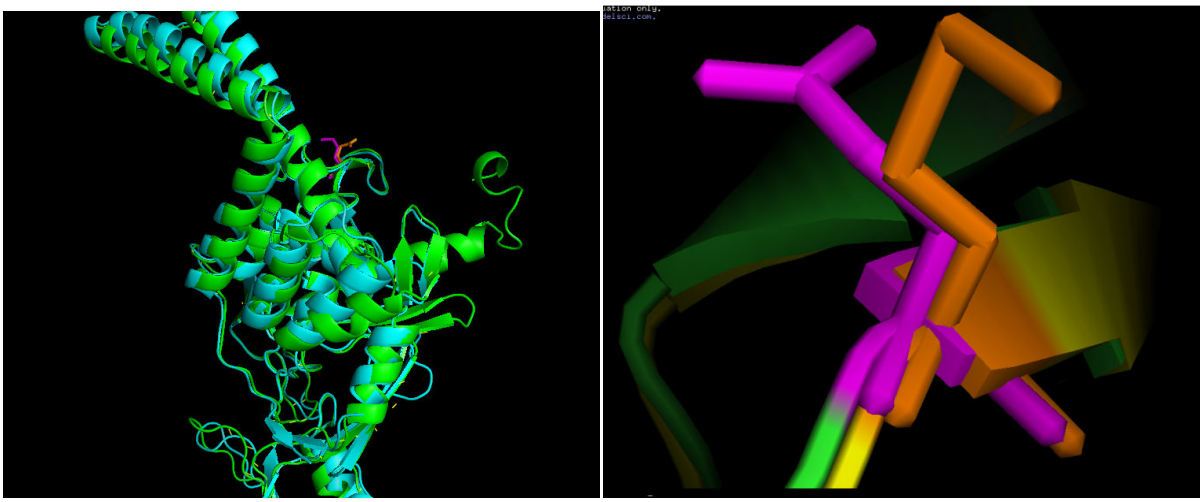


**Figura 7** – Dobramento da proteína GyrA na posição 154 em 3D através do programa PyMol. Em cor laranja observamos o aminoácido metionina (apolar) de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (azul) e em cor rosa, o aminoácido lisina (polar) de *M. fortuitum* (verde).

## 5.2 Determinantes de resistência à macrolídeos

Observamos a ocorrência de deleção parcial do gene *erm* em todos os isolados identificados como *M. abscessus* subsp. *bolletii* (antigamente denominado "*M. massiliense"*), conforme demonstrado na Figura 8.

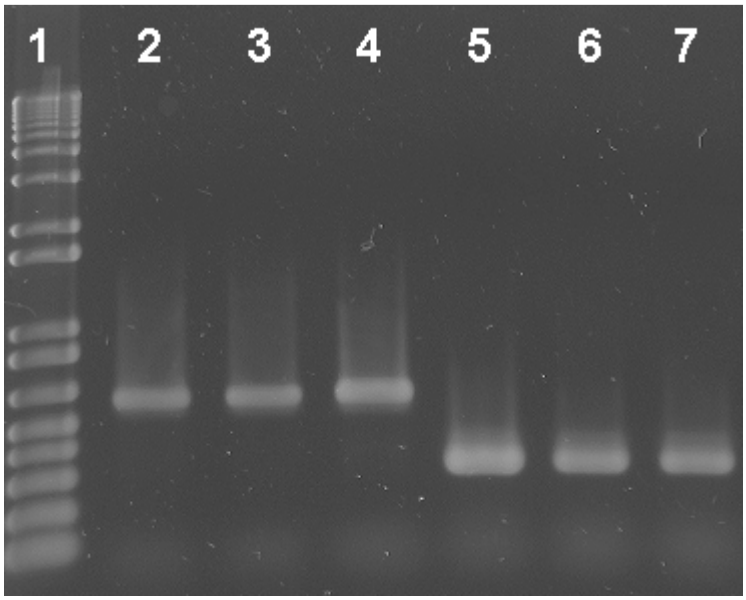



**Figura 8** – Gel de agarose evidenciando a deleção de aproximadamente 260 bp ocorrida em "*M. massiliense*" do produto de PCR para o gene *erm*. 1: marcador 1 Kb plus (Invitrogen); 2: F1041 *M. abscessus* subsp. *abscessus*; 3: F1070 *M. abscessus* subsp. *abscessus*; 4: F0440 *M. abscessus* subsp. *abscessus*; 5: F1973 *"M. massiliense";* 6: F1966 *"M. massiliense"*; 7: F1958 *"M. massiliense"*. Oligonucleotídeos: erm41-rpsA-5L e erm41-coaE-3L; temperatura de anelamento: 66°C.

Conforme descrito na introdução deste trabalho, para uma melhor avaliação dos genes observados, estabelecemos uma nomenclatura própria para este estudo descrita detalhadamente na Tabela 7.

**Tabela 7** – Nomenclatura de genes *erm* utilizados neste trabalho, descrição do depósito no GenBank e sugestão da nova nomenclatura a ser adotada.

| Nomenclatura utilizada neste trabalho | Depósito GenBank | Nomenclatura proposta | Espécie | Referência |
|---|---|---|---|---|
| *erm* (39) | AY487229.1 | *erm* (39) | *M. fortuitum* | Nash *et al*., 2005 |
| *erm* (41) | EU872495.1 | *erm* (41) | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | Nash *et al*., 2009 |
| *erm* (41) A | EU177504.2 | *erm* (50) | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | Nash *et al*., 2009 |
| *erm* (41) B | EU590124.1 | *erm* (51) | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | Nash *et al*., 2009 |
| *erm* (41) C | EU590125.1 | *erm* (52) | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | Nash *et al*., 2009 |
| *erm* (41) D | EU590126.1 | *erm* (53) | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | Nash *et al*., 2009 |
| *erm* (41) E | EU590127.1 | *erm* (54) | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | Nash *et al*., 2009 |
| *erm* (41) F | EU590129.1 | *erm* (55) | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | Nash *et al*., 2009 |
| *erm* (42) | EU590128.1 e FJ58488 | *erm* (42) | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | Nash *et al*., 2009 e Kim *et al*., 2010 |
| *erm* (45) | Identificado neste trabalho | *erm* (45) | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | Este trabalho |
| *erm* (46) | Identificado neste trabalho | *erm* (46) | *M. fortuitum* | Este trabalho |
| *erm* (47) | Identificado neste trabalho | *erm* (47) | *M. fortuitum* | Este trabalho |
| *erm* (48) | Identificado neste trabalho | *erm* (48) | *M. fortuitum* | Este trabalho |
| *erm* (49) | Identificado neste trabalho | *erm* (49) | *M. fortuitum* | Este trabalho |

Quando alinhadas as sequências de aminoácidos, foram observados cinco genes *erm* ainda não descritos na literatura, conforme demonstrado nas Figuras 9 e 10, denominados *erm*(45), *erm*(46), *erm*(47), *erm*(48) e *erm*(49).

```
                                  10        20        30        40        50        60
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
erm(41)-EU590128.1        VSGQRSRRQW GWYQLADDWA ADRRRIRFSF RGVRCESGRR ARRADGTSGC RWTLRAGITL
F2598-erm(45)             .....P.... .......... .......... .......... .......... ..........

                                  70        80
                          ....|....| ....|....| ....|....
erm(41)-EU590128.1        PRSTFHHPPQ VDSSVLVIRR R--------
F2598-erm(45)             .......... .......... .PCDRLRAC
```

**Figura 9** - Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *erm*(41) - depósito n° EU590128.1 no GenBank - e do isolado F2598 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii.* Notar a substituição no aminoácido 6, de uma serina para prolina, caracterizando um novo gene denominado *erm*(45).

```
                                  10        20        30        40        50        60
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
erm(39)-AY487229.1        VSSVHHGRHE NGQNFLRDRR VVGDIVRMVS HTAGPIVEIG AGDGALTLPL QRLGRPLTAI
F2477-Mfortuitum-erm(46)  ---------- -----..... .......... ..T....... .......... ..........
F2717-Mfortuitum-erm(47)  ---------- -----..... .......... ..TA...... .......... ..........
F2687-Mfortuitum-erm(48)  ---------- -----..... .......... ..T....... .......... ..........
F2536-Mfortuitum-erm(49)  ---------- -----..... .......... ..T....... .......... ..........

                                  70        80        90       100       110       120
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
erm(39)-AY487229.1        EIDLHRARRL ADRTTAEVIA TDFLRYRLPR TPHVVVGNLP FHLTTAILRR LLHENGWTDA
F2477-Mfortuitum-erm(46)  .......... ........V. .......... .......... .......... ..........
F2717-Mfortuitum-erm(47)  .......... ........V. .......... .......... .......... ..........
F2687-Mfortuitum-erm(48)  .......... ........V. .......... .......... .......... ..........
F2536-Mfortuitum-erm(49)  .......... ........V. .......... .......... .......... ..........

                                 130       140       150       160       170       180
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
erm(39)-AY487229.1        ILLVQWEVAR RRAGVGGATM MTAQWWPWFE FGLARKVSAD AFRPRPSVDA GLLTIQRRAE
F2477-Mfortuitum-erm(46)  .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2717-Mfortuitum-erm(47)  .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2687-Mfortuitum-erm(48)  .......... .......... .......... .......... ....Q..... ..........
F2536-Mfortuitum-erm(49)  .......... .......... .......... .......P.. .......... ..........

                                 190       200       210       220       230       240
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
erm(39)-AY487229.1        PLLPWADRRA YQALVHRVFT GRGRGLAQIL RPHVHPRWLS ANGIHPSALP RALTARQWVA
F2477-Mfortuitum-erm(46)  .......... .......... .......... .......... ---------- ----------
F2717-Mfortuitum-erm(47)  .......... .......... .......... .......... ---------- ----------
F2687-Mfortuitum-erm(48)  .......... .......... .......... .......... ---------- ----------
F2536-Mfortuitum-erm(49)  .......... .......... .......... .......... ---------- ----------
```

**Figura 10** - Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *erm*(39) - depósito n° AY487229.1 no GenBank - e dos isolados F2477, F2717, F2687 e F2536 de *Mycobacterium fortuitum.* Notar as substituições nos aminoácidos 33 (alanina→treonina), 34 (glicina→alanina), 79 (isoleucina→valina), 158 (serina→prolina) e 165 (arginina→glutamina), caracterizando novos genes denominados *erm*(46), *erm*(47), *erm*(48) e *erm*(49).

Na amostragem analisada, detectamos genes *erm* intrínsecos a cada espécie (Tabelas 8 a 10). Em isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* não foi detectada nenhuma proteína Erm diferente das já depositadas no GenBank, diferentemente do que observamos em *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. fortuitum.*

**Tabela 8** – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para claritromicina, após 3 e 14 dias, identificação do gene *erm* e sua porcentagem de similaridade com a sequência de aminoácidos depositada no GenBank dos 20 isolados de *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus.* Em destaque (cor azul) observamos as amostras sensíveis à claritromicina. Depósitos correspondentes: erm(41)=EU872495.1; *erm*(41)D=EU590126.1; *erm*(41)E=EU590127.1; *erm*(41)F=EU590129.1.

| Isolado clínico | Espécie bacteriana | CIM (µg/mL) para claritro: | | *erm* | % de similaridade da sequência de aa com o depósito |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 dias | 14 dias | | |
| F1326 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.25 | ≥16 | *erm* (41) D | 100% |
| F1350 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 1 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F2098 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.25 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F2176 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.5 | ≥16 | *erm* (41) D | 100% |
| F2394 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.25 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F2503 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 1 | ≥16 | *erm* (41) D | 100% |
| F2484 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 1 | ≥16 | *erm* (41) D | 100% |
| F2523 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | ≥16 | ≥16 | *erm* (41) F | 100% |
| F2493 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.5 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F2534 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.5 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F2504 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.12 | ≥16 | *erm* (41) D | 100% |
| F2535 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.12 | ≥16 | *erm* (41) D | 100% |
| F2542 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.5 | ≥16 | *erm* (41) D | 100% |
| F2558 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.25 | ≥16 | *erm* (41) | 100% |
| F2651 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.5 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F2649 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 1 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F2650 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F1041 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F1070 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0.25 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |
| F0440 | *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 4 | ≥16 | *erm* (41) E | 100% |

**Tabela 9** – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para claritromicina, após 3 e 14 dias, identificação do gene *erm* e sua porcentagem de similaridade com a sequência de aminoácidos depositada no GenBank dos 19 isolados de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii.* Em destaque (cor azul) observamos as amostras sensíveis à claritromicina. Verificamos uma substituição no resíduo de aminoácido S6P, caracterizando um gene novo – *erm*(45). Depósito correspondente: *erm*(42)=EU590128.1 e FJ58488.

| Isolado clínico | Espécie bacteriana | CIM (µg/mL) para claritro: | | *erm* | Substituição encontrada: | % de similaridade da sequência de aa com o depósito |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 dias | 14 dias | | S6P | |
| F1464 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥16 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |
| F1973 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≤0.06 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |
| F1966 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.5 | 0.5 | *erm* (42) | | 100% |
| F1958 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.5 | 0.5 | *erm* (42) | | 100% |
| F1985 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.5 | 0.5 | *erm* (42) | | 100% |
| F1987 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 1 | 1 | *erm* (42) | | 100% |
| F2002 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≤0.06 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |
| F2061 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.5 | 0.5 | *erm* (42) | | 100% |
| F2085 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.25 | 0.25 | *erm* (42) | | 100% |
| F2105 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.25 | 0.25 | *erm* (42) | | 100% |
| F2122 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≤0.06 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |
| F2111 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.25 | 0.25 | *erm* (42) | | 100% |
| F2149 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.25 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |
| F2209 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥16 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |
| F2370 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 2 | 2 | *erm* (42) | | 100% |
| F2369 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0.12 | 0.12 | *erm* (42) | | 100% |
| F2598 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≤0.06 | ≥16 | *erm* (45) | x | |
| F2599 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥16 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |
| F2795 | *M. abscessus* subsp. *bolletii* | ≥16 | ≥16 | *erm* (42) | | 100% |

**Tabela 10** – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) para claritromicina, após 3 e 14 dias, identificação do gene *erm* e sua porcentagem de similaridade com a sequência de aminoácidos depositada no GenBank dos 20 isolados de *Mycobacterium fortuitum.* Em destaque (cor azul) observamos as amostras sensíveis à claritromicina. Verificamos substituições nos resíduos de aminoácidos A33T, G34A, I79V, S158P e R165Q, caracterizando genes novos – *erm*(46), *erm*(47), *erm*(48) e *erm*(49). Depósito correspondente: *erm*(39)=AY487229.1.

| Isolado clínico | Espécie bacteriana | CIM (µg/mL) para claritro: | | *erm* | Substituições encontradas: | | | | | % de similaridade da sequência de aa com o depósito |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 dias | 14 dias | | A33T | G34A | I79V | S158P | R165Q | |
| F2477 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2488 | *M. fortuitum* | 8 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2491 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2495 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2502 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (39) | | | | | | 100% |
| F2527 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2536 | *M. fortuitum* | 0.12 | ≥16 | *erm* (49) | x | | x | x | | |
| F2577 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2602 | *M. fortuitum* | 8 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2613 | *M. fortuitum* | 4 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2614 | *M. fortuitum* | 8 | ≥16 | *erm* (49) | x | | x | x | | |
| F2639 | *M. fortuitum* | 8 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2680 | *M. fortuitum* | 16 | ≥16 | *erm* (49) | x | | x | x | | |
| F2686 | *M. fortuitum* | 8 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2687 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (48) | x | | x | | x | |
| F2715 | *M. fortuitum* | 16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2717 | *M. fortuitum* | 8 | ≥16 | *erm* (47) | x | x | x | | | |
| F2755 | *M. fortuitum* | ≥16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2757 | *M. fortuitum* | 16 | ≥16 | *erm* (46) | x | | x | | | |
| F2815 | *M. fortuitum* | 8 | ≥16 | *erm* (49) | x | | x | x | | |

## 5.3 Identificação de plasmídios do grupo de incompatibilidade P (IncP)

Dos 125 isolados, de diferentes espécies de micobactérias, submetidos à PCR para íterons de plasmídios IncP, apenas 13,6% (n=17) foram identificados contendo plasmídio IncP (Tabela 11), sendo que todos pertencem à subespécie *M. abscessus* subsp. *bolletii* ("*M. massiliense*").

**Tabela 11** – Total de isolados de cada espécie bacteriana submetidos a PCR para íterons de plasmídios IncP.

| Espécie bacteriana | N° de isolados | PCR IncP positivo |
|---|---|---|
| *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 23 | 0 |
| *M. abscessus* subsp. *bolletii ("M. massiliense"* ) | 40 | 17 |
| *M. fortuitum* | 22 | 0 |
| *M. chelonae* | 15 | 0 |
| *M. porcinum* | 1 | 0 |
| *M. smegmatis* | 1 | 0 |
| *M. vaccae* | 1 | 0 |
| *M. imunogenum* | 5 | 0 |
| *M. abscessus* subsp. *bolletii* ("*M. bolletii* ") | 13 | 0 |
| *M. mucogenicum* | 4 | 0 |
| TOTAL | 125 | 17 |

Das dezessete amostras positivas para IncP, foram selecionadas aleatoriamente cinco para sequenciamento para confirmação dos resultados observados na PCR com os oligonucleotídeos desenhados neste trabalho, conforme demonstrado na Figura 11.

Todos os isolados possuem 100% de similaridade à região entre os nucleotídeos 42380 e 42736 do depósito CP003505.2 referente ao plasmídio pBRA-100 descrito por Pelegrino e colaboradores em 2012.

```
                                  42330     42340     42350     42360     42370     42380     42390     42400
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
pBRA100-CP003505.2        GAGGGGGCTT TGCCCCCTCG CAAGCTCTCG AACTTACTGC CTTCCGCCAG GCGCTTGCGC CTGGCTCTCC TAAGCCGTAG
F1757-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------. .......... ..........
F1761-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------. .......... ..........
F1819-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------. .......... ..........
F2085-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
F2369-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------. .......... ..........

                                  42410     42420     42430     42440     42450     42460     42470     42480
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
pBRA100-CP003505.2        CGCCGAAGGC GCTCCATTGT GGGGTGAGGC CGCAAGGCGG CCGAGGGGCG TAGCCCCTGG GGGGATGGGA GGCCGCTTGC
F1757-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F1761-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F1819-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2085-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
F2369-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

                                  42490     42500     42510     42520     42530     42540     42550     42560
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
pBRA100-CP003505.2        GGCCGGGTGG GATCGAGAAG GGGGGTTTCC CCCCTTCGGC GGCCGGTCAT GCTGCGCGGT AGCTTGGGCC GTGTTGCCGT
F1757-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F1761-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F1819-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2085-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- .......... .......... ..........
F2369-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

                                  42570     42580     42590     42600     42610     42620     42630     42640
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
pBRA100-CP003505.2        TTTTTTCGCC AGCCTCTGGT TAAAACTACC TGGTTATATA AAAAGGTTAT AAAGACGGTT AAAAACCTGG TTAGCATGAC
F1757-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F1761-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F1819-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2085-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2369-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

**Continua...**

```
                                  42650     42660     42670     42680     42690     42700     42710     42720
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
pBRA100-CP003505.2        CGAAAAACGC GCGTAAACCG TTGTCACGCC AAGGAAAAGC GCGAAGAGGC CGCCCCTCAA GTGTCAATGG ATAAGCCCCC
F1757-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F1761-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......---
F1819-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2085-M.absc.subsp.bolletii .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
F2369-M.absc.subsp.bolletii .......... .......-- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                                  42730     42740     42750     42760     42770     42780     42790     42800
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
pBRA100-CP003505.2        CATGTGTCAA TACGCTGCCC CTCAAGTGTC AAGAACCGCG CCCCTCAAGT GTCAGTAGGG CCGCCCCTCA AGTGTCAATA
F1757-M.absc.subsp.bolletii .......... ......---- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
F1761-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
F1819-M.absc.subsp.bolletii .......... ......---- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
F2085-M.absc.subsp.bolletii .......... ......---- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
F2369-M.absc.subsp.bolletii ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

**Figura 11** – Alinhamento da região de iterons de plasmídios IncP (aminoácidos 42380 a 42736) de cinco isolados clínicos de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* com 100% de similaridade ao depósito (n° CP003505.2) do plasmídio pBRA-100 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* F1725 (56265 bp) por Pelegrino e colaboradores, 2012.

## 5.4 Avaliação da clonalidade

Foram selecionados aleatoriamente 13 isolados de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* ("*M. massiliense*") para avaliação da clonalidade e correlação com a presença do plasmídio IncP. Utilizando-se o ERIC-PCR e índice de similaridade mínimo de 92% para definição de grupos clonais, foram detectados 3 grupos clonais designados ERIC1 a ERIC3 (Figura 12). Nos grupos clonais ERIC1 e ERIC3 todas as amostras possuem o plasmídio IncP, enquanto que no grupo clonal ERIC 2 um dos isolados não possui este plasmídio.

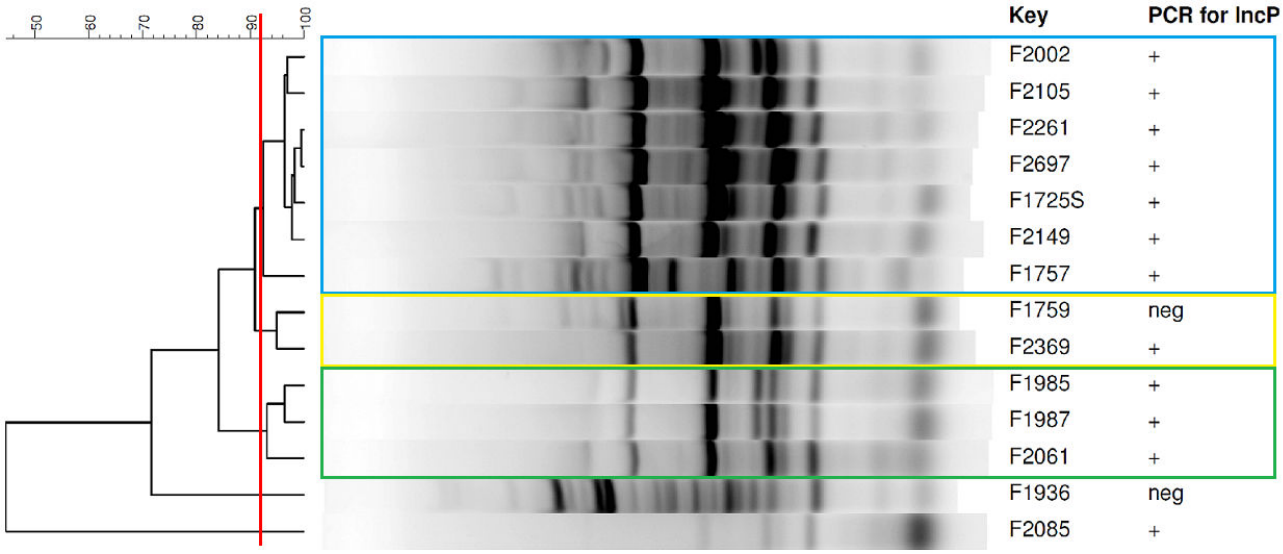



**Figura 12** - Análise da clonalidade (índice de similaridade >92%) e correlação com a presença do plasmídio do grupo de incompatibilidade P (IncP). Análise realizada utilizando-se coeficiente de correlação de Pearson.

## 5.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade

Observou-se que os isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* apresentaram $MIC_{50}$ e $MIC_{90}$ acima do ponto de corte de resistência descrito no CLSI para ciprofloxacino e moxifloxacino, ≥8µg/mL e ≥16µg/mL, respectivamente (Tabela 12). Já as amostras pertencentes à espécie *M. fortuitum* possuem $MIC_{50}$ (≤0.06µg/mL) e $MIC_{90}$ (0.5µg/mL) abaixo do ponto de corte de sensibilidade (≤1µg/mL).

Quando avaliada a ação do antimicrobiano amicacina contra os isolados do Grupo *M. abscessus*, verificou-se que o $MIC_{50}$ (16µg/mL) ficou abaixo do ponto de corte de sensibilidade descrito no documento do CLSI (≤16µg/mL), porém o $MIC_{90}$ (64µg/mL) foi caracterizado por resistência (≥64µg/mL). Para a espécie *M. fortuitum*, os $MIC_{50}$ (≤0,5µg/mL) e $MIC_{90}$ (2µg/mL) estavam abaixo do limite de sensibilidade (≤16µg/mL).

Para a claritromicina, os isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* apresentaram $MIC_{50}$ (0,5 µg/mL) abaixo do ponto de corte de sensibilidade (≤2µg/mL), porém o $MIC_{90}$ (4µg/mL) caracteriza uma sensibilidade reduzida a este antimicrobiano (4µg/mL). A amostragem de "*M. massiliense*" mostrou-se semelhante quando comparada ao $MIC_{50}$ de *M. abscessus*, porém, com $MIC_{90}$ (≥32µg/mL) acima do ponto de corte de resistência (≥8µg/mL). Já aquelas pertencentes à espécie *M. fortuitum*, apresentaram $MIC_{50}$ (16µg/mL) e $MIC_{90}$ (≥32µg/mL) característicos de cepas resistentes (≥8µg/mL).

Como as amostras foram reincubadas por 14 dias para verificação de resistência indutiva à claritromicina, observamos que os $MIC_{50}$ e $MIC_{90}$ de toda a amostragem deste trabalho estão acima dos pontos de corte de resistência (≥32µg/mL).

**Ciprofloxacino**

| Espécies | N°. (% cumulativa) de isolados inibidos pela CIM (µg/mL) de: | | | | | | | | N°. de isolados testados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ≤0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | ≥8 | |
| *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 1 (2) | 0 (2) | 0 (2) | 0 (2) | 0 (2) | 7 (10) | 11 (23) | 66 (100) | 83 |
| *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 1 (4) | 0 (4) | 0 (4) | 0 (4) | 1 (8) | 2 (16) | 1 (20) | 21 (100) | 26 |
| *M. fortuitum* | 17 (85) | 0 (85) | 0 (85) | 1 (90) | 0 (90) | 1 (95) | 1 (100) | 0 | 20 |

**Moxifloxacino**

| Espécies | N°. (% cumulativa) de isolados inibidos pela CIM (µg/mL) de: | | | | | | | | N°. de isolados testados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ≤0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | ≥16 | |
| *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 1 (2) | 0 (2) | 0 (2) | 0 (2) | 0 (2) | 7 (10) | 10 (22) | 67 (100) | 83 |
| *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 1 (4) | 0 (4) | 1 (8) | 0 (8) | 2 (16) | 2 (24) | 0 (24) | 20 (100) | 26 |
| *M. fortuitum* | 19 (95) | 0 (95) | 0 (95) | 2 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |

**Amicacina**

| Espécies | N°. (% cumulativa) de isolados inibidos pela CIM (µg/mL) de: | | | | | | | | | N°. de isolados testados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ≤0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | ≥128 | |
| *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 1 (2) | 0 (2) | 1 (3) | 5 (9) | 16 (29) | 49 (89) | 0 (89) | 9 (100) | 0 | 81 |
| *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 1 (5) | 0 (5) | 2 (15) | 4 (34) | 4 (53) | 4 (72) | 1 (77) | 5 (100) | 0 | 21 |
| *M. fortuitum* | 17 (85) | 0 (85) | 2 (95) | 1 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |

**Claritromicina**

| Espécies | N°. (% cumulativa) de isolados inibidos pela CIM (µg/mL) de: | | | | | | | | | | | N°. de isolados testados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ≤0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | ≥32 | |
| *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 2 (3) | 0 (3) | 6 (10) | 20 (35) | 13 (51) | 19 (75) | 10 (87) | 3 (91) | 0 (91) | 2 (93) | 6 (100) | 81 |
| *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 4 (18) | 0 (18) | 3 (31) | 4 (48) | 4 (66) | 1 (70) | 1 (74) | 0 (74) | 0 (74) | 0 (79) | 4 (100) | 21 |
| *M. fortuitum* | 0 (0) | 0 (0) | 1 (5) | 0 (5) | 0 (5) | 0 (5) | 0 (5) | 1 (10) | 7 (45) | 3 (60) | 8 (100) | 20 |

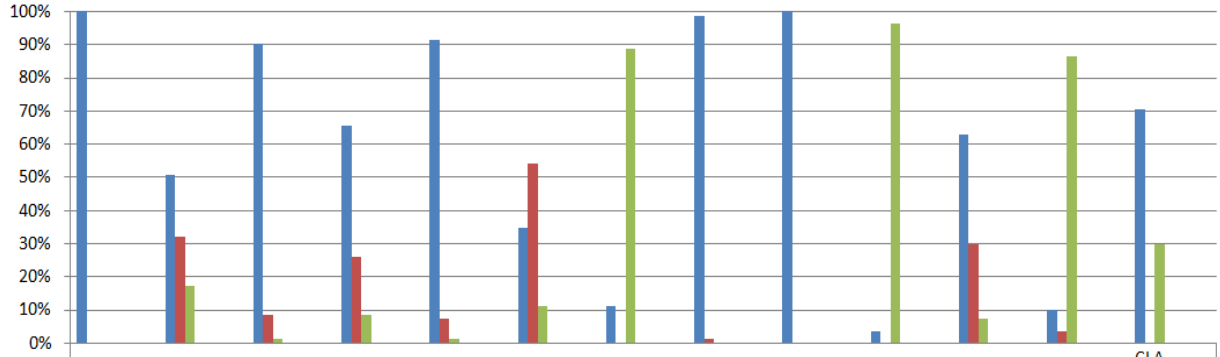
**Claritromicina (após 14 dias)**

| Espécies | N°. (% cumulativa) de isolados inibidos pela CIM (µg/mL) de: | | | | | | | | | | | N°. de isolados testados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ≤0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | ≥32 | |
| *M. abscessus* subsp. *abscessus* | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 7 (9) | 7 (18) | 3 (21) | 7 (30) | 0 (30) | 0 (30) | 0 (30) | 57 (100) | 81 |
| *M. abscessus* subsp. *bolletii* | 0 (0) | 0 (0) | 1 (5) | 3 (18) | 4 (35) | 1 (40) | 1 (44) | 0 (44) | 0 (44) | 0 (44) | 11 (100) | 21 |
| *M. fortuitum* | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (10) | 18 (100) | 20 |

**Tabela 12** – Quantidade de isolados e sua respectiva porcentagem cumulativa referente a cada CIM (µg/mL) observada frente aos antimicrobianos ciprofloxacino, moxifloxacino, amicacina e claritromicina (após 3 e 14 dias).

Nos isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (Figura 13) observamos que mais de 99% da amostragem foi resistente aos antimicrobianos trimetoprim/sulfametoxazol, doxiciclina e minociclina; entretanto, 96% foi sensível à tigeciclina após 72 horas de incubação.

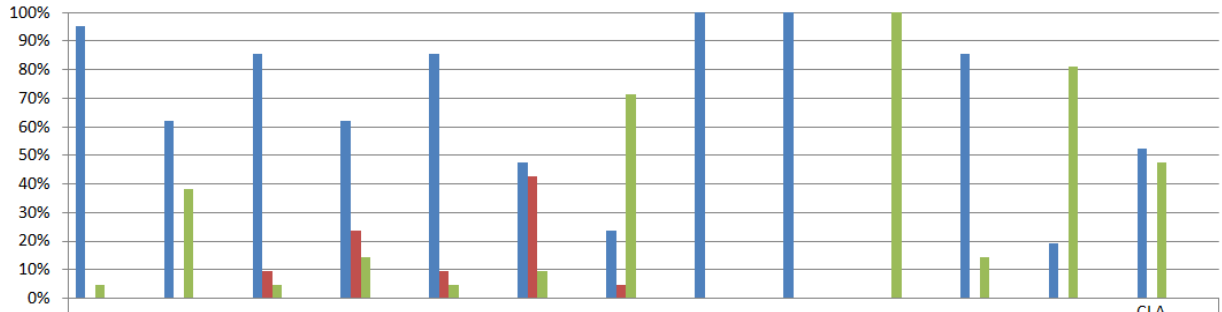
Para linezolida, imipenem, cefoxitina e tobramicina, os isolados apresentaram sensibilidade reduzida ou resistência em mais de 50% da amostragem.




| | SXT | LZD | CIP | IMI | MXF | FOX | AMI | DOX | MIN | TGC | TOB | CLA | CLA (14 DIAS) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Resistente | 100% | 51% | 90% | 65% | 91% | 35% | 11% | 99% | 100% | 4% | 63% | 10% | 70% |
| Intermediário | 0% | 32% | 9% | 26% | 7% | 54% | 0% | 1% | 0% | 0% | 30% | 4% | 0% |
| Sensível | 0% | 17% | 1% | 9% | 1% | 11% | 89% | 0% | 0% | 96% | 7% | 86% | 30% |

**Figura 13** – Perfil de susceptibilidade de 81 isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Antimicrobianos: SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; LZD – linezolida; CIP – ciprofloxacina; IMI – imipenem; MXF – moxifloxacina; FOX – cefoxitina; AMI – amicacina; DOX – doxiciclina; MIN – minociclina; TGC – tigeciclina; TOB – tobramicina; CLA – claritromicina.

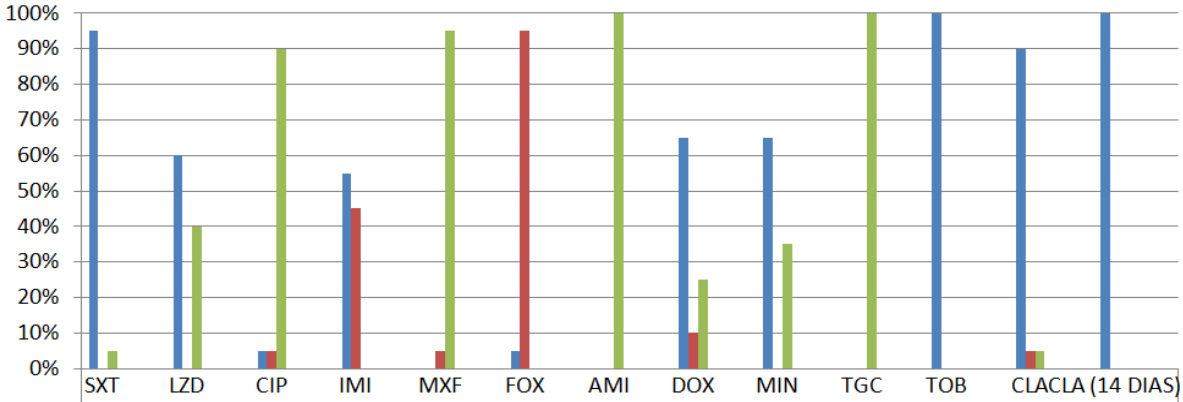
No caso de amostras pertencentes à espécie *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Figura 14), observamos um perfil de susceptibilidade semelhante ao verificado em *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Os isolados, frente às drogas trimetoprim/sulfametoxazol, doxiciclina e minociclina apresentam resistência superior a 95%, enquanto, que em tigeciclina a sensibilidade é de 100%. Já para os demais antimicrobianos – linezolida, imipenem, cefoxitina e tobramicina – mais de 50% dos isolados possuem resistência ou sensibilidade reduzida.




| | SXT | LZD | CIP | IMI | MXF | FOX | AMI | DOX | MIN | TGC | TOB | CLA | CLA (14 DIAS) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Resistente | 95% | 62% | 86% | 62% | 86% | 48% | 24% | 100% | 100% | 0% | 86% | 19% | 52% |
| Intermediário | 0% | 0% | 10% | 24% | 10% | 43% | 5% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Sensível | 5% | 38% | 5% | 14% | 5% | 10% | 71% | 0% | 0% | 100% | 14% | 81% | 48% |

**Figura 14** – Perfil de susceptibilidade de 21 isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Antimicrobianos: SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; LZD – linezolida; CIP – ciprofloxacina; IMI – imipenem; MXF – moxifloxacina; FOX – cefoxitina; AMI – amicacina; DOX – doxiciclina; MIN – minociclina; TGC – tigeciclina; TOB – tobramicina; CLA – claritromicina.

Os isolados de *M. fortuitum* (Figura 15) apresentaram 100% de resistência à tobramicina e 100% de sensibilidade à tigeciclina. Para os antimicrobianos linezolida, imipenem, cefoxitina, doxiciclina e minociclina, foram observados mais de 50% de resistência ou sensibilidade reduzida.




| | SXT | LZD | CIP | IMI | MXF | FOX | AMI | DOX | MIN | TGC | TOB | CLA | CLA (14 DIAS) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Resistente | 95% | 60% | 5% | 55% | 0% | 5% | 0% | 65% | 65% | 0% | 100 | 90% | 100 |
| Intermediário | 0% | 0% | 5% | 45% | 5% | 95% | 0% | 10% | 0% | 0% | 0% | 5% | 0% |
| Sensível | 5% | 40% | 90% | 0% | 95% | 0% | 100 | 25% | 35% | 100 | 0% | 5% | 0% |

**Figura 15** – Perfil de susceptibilidade de 20 isolados de *M. fortuitum*. Antimicrobianos: SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; LZD – linezolida; CIP – ciprofloxacina; IMI – imipenem; MXF – moxifloxacina; FOX – cefoxitina; AMI – amicacina; DOX – doxiciclina; MIN – minociclina; TGC – tigeciclina; TOB – tobramicina; CLA – claritromicina.

Em todos os lotes de testes as cepas de controle de qualidade *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram utilizadas e os resultados obtidos situaram-se dentro dos limites aceitáveis de acordo com o documento M24-A (CLSI 2003).

## 5.6 Perfil plasmidial da cepa *Escherichia coli* TOP-Myco

Para verificação da integridade do plasmídio pBRA-100 (grupo IncP) da cepa *Escherichia coli* TOP-Myco, para realização dos ensaios de conjugação e estabilidade, foi realizada a extração do plasmídio através do método de lise alcalina (Birnboim and Doly 1979; Sambrook and Russell 2001) e observou-se um fragmento de tamanho aproximado de 56.2 kb (Figura 16).

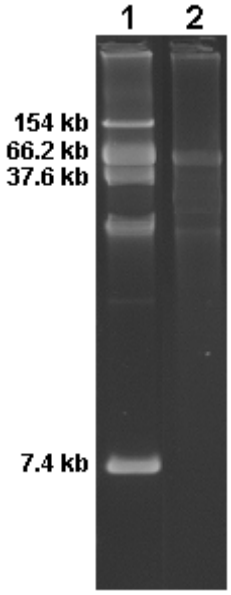



**Figura 16** – Perfil plasmidial da cepa *Escherichia coli* TOP-Myco contendo o plasmídio pBRA-100 de *Mycobacterium abscessus* subsp.*bolletii* F1725 – depósito n° CP003505.2 GenBank por Pelegrino e colaboradores, 2012. Amostras: 1) *Escherichia coli* 39R861 NCTC 50192 contendo plasmídios de 154 kb, 66.2 kb, 37.6 kb e 7.4 kb; 2) *Escherichia coli* TOP-Myco contendo plasmídio de 56.2 kb.

## 5.7 Ensaios de conjugação

Para semeadura da conjugação entre as cepas *Escherichia coli* TOP-Myco e *Escherichia coli* J53, foram preparadas placas de ágar LB contendo 16µg/mL de kanamicina e 62.5µg/mL de azida sódica (Figura 17).

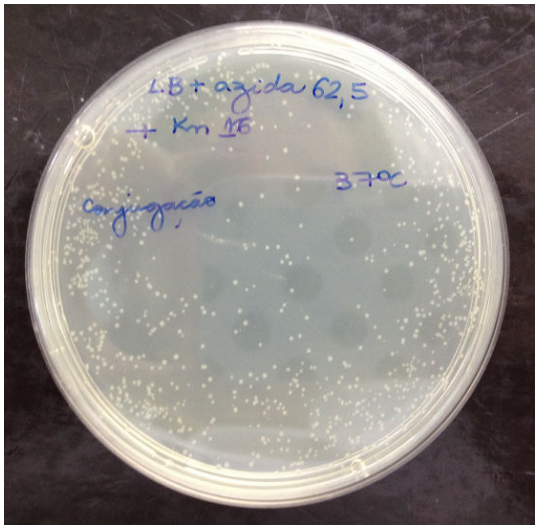



**Figura 17** – Placa contendo ágar LB com 16µg/mL de kanamicina e 62.5µg/mL de azida sódica após incubação por 24 horas a 36±1°C da conjugação entre as cepas *Escherichia coli* TOP-Myco e *Escherichia coli* J53.

Após 24 horas de incubação, foi realizada a contagem de colônias. A frequência de conjugação foi de $3{,}7 \times 10^{-9}$. Para confirmação da presença do plasmídio pBRA-100 nos transconjugantes foi realizada a PCR para o grupo IncP de 12 colônias reisoladas das placas de conjugação. Todos os transconjugantes testados possuíam o plasmídio pBRA-100 (Figura 18).

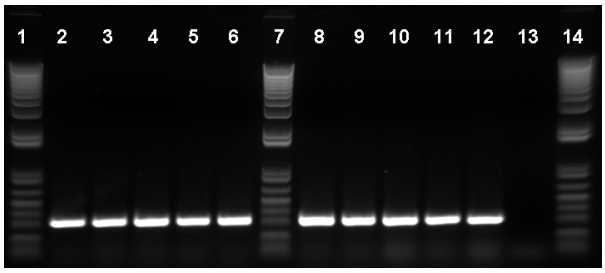



**Figura 18** – PCR para grupo IncP dos 12 transconjugantes reisolados da conjugação entre as cepas *Escherichia coli* TOP-Myco e *Escherichia coli* J53. Gel de agarose: 1, 7 e 14 – Marcadores 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 2 à 12 – Transconjugantes; 13 – Controle negativo.

## 5.8 Ensaio de estabilidade plasmidial

Os resultados do ensaio de estabilidade plasmidial foram tabulados, sendo avaliada a razão entre logaritmo decimal da contagem de unidades formadoras de colônias em meio com e sem kanamicina. Os repiques subcultivos da cepa *Escherichia coli* TOP-Myco foram realizados por 57 dias consecutivos (Figura 19).

Como esta metodologia foi realizada em triplicata, obtivemos um mínimo da razão de 0.9775 e máximo de 1.0616 da colônia 1; mínimo de 0.9349 e máximo de 1.0518 da colônia 2; mínimo de 0.9517 e máximo de 1.0971 da colônia 3.

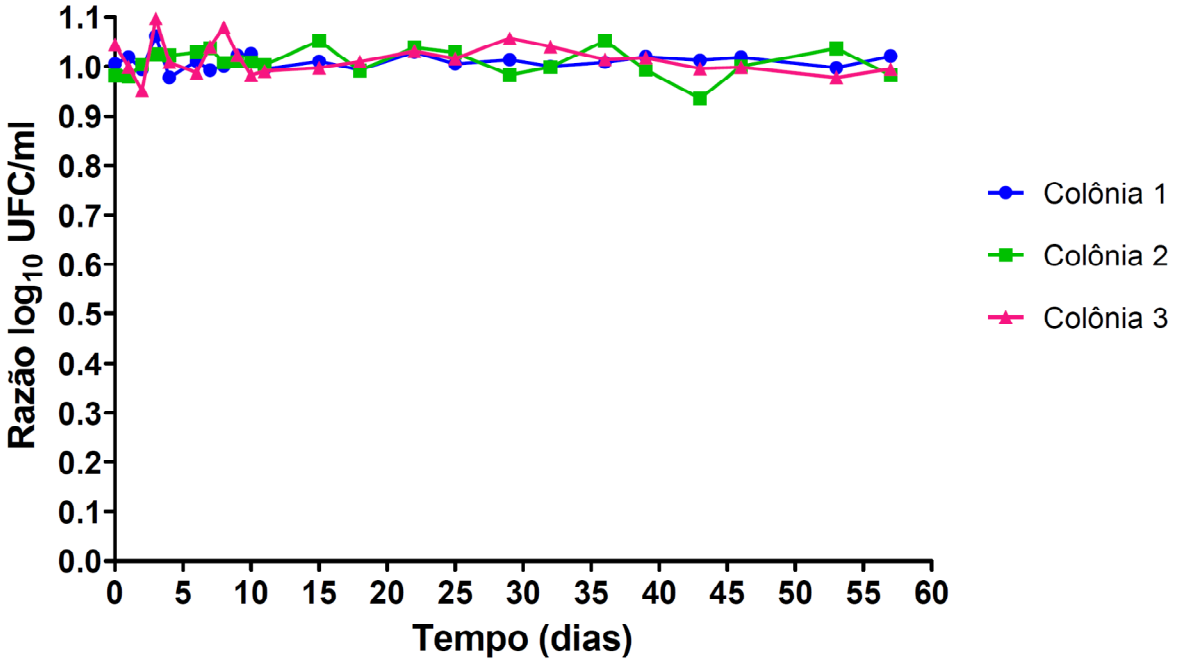



**Figura 19** – Ensaio de estabilidade do plasmídio pBRA-100 em *Escherichia coli* TOP10.

# 6 DISCUSSÃO

## 6.1 Determinantes de resistência à fluorquinolonas

Na região QRDR, que abrange os resíduos 67 a 106 de aminoácidos, observou-se a substituição S83W em amostras de *M. fortuitum* resistentes à ciprofloxacino, descrita apenas em *Escherichia coli* (Gruger, Nitiss et al. 2004), caracterizando uma nova substituição em micobactérias.

Em isolados pertencentes ao Grupo *M. abscessus*, intrinsecamente resistentes à ciprofloxacina, observamos um resíduo de alanina na posição 83, como previamente descrito na literatura (Guillemin, Cambau et al. 1995). Nossos achados contrastam com aqueles da literatura, pois duas cepas sensíveis à ciprofloxacino e moxifloxacino apresentam a mesma substituição. Esta substituição, portanto, não influencia na resistência a ciprofloxacino, pois, conforme observado na Figura 6, as amostras F2854 e F1973 são sensíveis a este antimicrobiano e possuem o mesmo resíduo de aminoácido nesta posição.

Como demonstrado por Moura e colaboradores (Moura, Silva et al. 2012), quando um fragmento pequeno da região QRDR é amplificada, não nos permite visualizar mutações, por isso, neste estudo foram desenhados pares de oligonucleotídeos para amplificação e sequenciamento de regiões que flanqueiam a região QRDR do gene *gyrA*.

Na posição 117 foi observada a substituição de uma prolina por alanina (ambos aminoácidos apolares), porém não influenciando na resistência a este antimicrobiano. De mesmo modo, observamos no resíduo 154 a substituição de um aminoácido glutamina (polar) por metionina (apolar), porém, mesmo após realização da conformação 3D da proteína GyrA e observação de completa alteração em sua estrutura terciária, concluímos que esta substituição não está associada à resistência à ciprofloxacina, pois os isolados sensíveis a estes antimicrobianos também apresentaram tal substituição.

Quanto aos alinhamentos realizados com as amostras submetidas ao sequenciamento parcial do gene *gyrB*, não foram observadas substituições capazes de levar à resistência à ciprofloxacino. A proteína tem função de ATPase e portanto interage indiretamente no processo de resistência a quinolonas.

Considerando a ausência de mutações na região QRDR, é provável que outro mecanismo de resistência às fluorquinolonas seja predominante em *M. abscessus*. Uma das possibilidades é resistência mediada por efluxo, acetilação ou nitrosilação, não estudadas neste trabalho (Liu, Takiff et al. 1996; Adjei, Heinze et al. 2007; Bellinzoni, Buroni et al. 2009).

## 6.2 Determinantes de resistência à macrolídeos

Nash e colaboradores (2009) depositaram no GenBank oito sequências peptídicas com o mesmo nome - *erm*(41) - contendo substituições distintas. Com isso, alinhamos as sequências dos genes *erm* dos isolados analisados neste estudo, com aquelas dos depósitos disponíveis no GenBank referentes aos genes *erm*(39), *erm*(41) *e erm*(42) para identificação dos genes *erm* presentes em nossa amostragem.

Para facilitar esta identificação, renomeamos os genes *erm*(41) com o auxílio de letras do alfabeto, de acordo com a ordem dos depósitos no GenBank (*erm*(41)A a *erm*(41)F). Também observamos que os distintos depósitos EU590128.1 (*erm*(41)) e FJ58488 (*erm*(42)), possuem a mesma sequência peptídica, sendo assim, denominada *erm*(42) neste trabalho.

Algumas sequências analisadas não possuíam 100% de similaridade com nenhum gene *erm* já descrito, com isso, concluímos a descoberta de cinco novas substituições ainda não descritas na literatura:

→ *erm*(45): substituição de uma serina para prolina no resíduo 6 de aminoácido (S6P) em um isolado de *M. abscessus* subsp. *bolletii*;

→ *erm*(46): substituições nos resíduos 33 e 79 em isolados de M. fortuitum, sendo, de alanina (apolar) para treonina (polar) e isoleucina (apolar) para valina (apolar), respectivamente (A33T e I79V);

→ *erm*(47): contém as mesmas substituições encontradas no *erm*(46) em *M. fortuitum*, porém também há a substituição de uma glicina para alanina, ambas apolares, no resíduo 34 de aminoácido (G34A);

→ *erm*(48): observamos somente na espécie *M. fortuitum* as substituições que originaram a nomenclatura deste gene. Há duas substituições anteriormente descritas: A33T e I79V, porém, no resíduo 165 de aminoácido, há a alteração de uma arginina para glutamina (R165Q – ambos polares);

→ *erm*(49): este novo gene possui três substituições: A33T, I79V e S158P (serina para prolina no resíduo 158 de aminoácido) e foi observado apenas em *M. fortuitum*.

Nossos achados indicam que há uma forte correlação entre o tipo de gene erm e a espécie bacteriana:

→ *M. abscessus* subsp. *abscessus*: 55% das amostras com gene *erm*(41)E; 35% com gene *erm*(41)D; e, 5% cada gene *erm*(41)F e *erm*(41).

→ *M. abscessus* subsp. *bolletii*: 94% dos isolados possuem o gene *erm*(42) e 6% o gene *erm*(45).

→ *M. fortuitum*: observamos 65% da amostragem contendo gene *erm*(46); 20% gene *erm*(49) e 5% cada gene *erm*(39), *erm*(47) e *erm*(48).

Nas espécies *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. fortuitum*, observamos 100% de correlação entre a presença de um gene *erm* e o fenótipo de resistência indutiva à claritromicina. Porém, esta correlação diminui para 48% em isolados pertencentes à espécie *M. abscessus* subsp. *bolletii*, que possuem uma deleção de aproximadamente 260 bp nos genes sequenciados, anteriormente descrita por Kim e colaboradores (Kim, Kim et al. 2010). Portanto, é provável que não haja relação

entre a presença do gene parcialmente deletado e a expressão do fenótipo indutivo, visto que em 52% da amostragem foi observada a presença do gene *erm,* porém, este não induziu altos níveis de resistência a claritromicina após 14 dias de incubação.

Propomos a readequação da designação dos genes *erm*(41) descritos por Nash e colaboradores em 2009, conforme descrito na Tabela 7, pois oito depósitos contendo substituições de aminoácidos não podem receber a mesma nomenclatura, visto que suas sequências de aminoácidos são distintas.

## 6.3 Identificação de plasmídios do grupo de incompatibilidade P (IncP)

Para amplificação das regiões de íterons de plasmídios IncP foram utilizados inicialmente os oligonucleotídeos descritos por Carattoli e colaboradores (Carattoli, Bertini et al. 2005), porém ocorria amplificação de dois fragmentos distintos quando os produtos amplificados eram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Portanto, optou-se por baixar a sequência de nucleotídeos do plasmídio pBRA-100 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* F1725 (depósito CP003505.2) do GenBank para montagem de um par de oligonucleotídeos que amplificasse a região integral para esta identificação (aminoácidos 42380 a 42736). Somente 13,6% dos isolados analisados possuem o plasmídio IncP, sendo que, todos pertencem à espécie "*M. massiliense*". Houve 100% de similaridade com o depósito CP003505.2 referente ao plasmídio pBRA-100 de *M. abscessus* subsp. *abscessus* F1725, descrito por Pelegrino e colaboradores em 2012. Apesar de haver necessidade de testar mais isolados, é intrigante a detecção de plasmídios IncP apenas em "*M. massiliense*". Uma das possibilidades é que apenas essa espécie é capaz de conjugar com outros gêneros bacterianos.

## 6.4 Avaliação da clonalidade

Os treze isolados avaliados quanto à clonalidade e correlação com a presença ou ausência do plasmídio IncP pertencem a três grupos clonais distintos – ERIC 1 a ERIC 3 – quando utilizado índice de similaridade mínimo de 92%. Em toda a amostragem dos grupos ERIC 1 e ERIC 3, observamos a presença do plasmídio IncP, enquanto que no grupo clonal ERIC 2 apenas um dos isolados o possui. Esses achados sugerem que pode haver transferência do plasmídio entre cepas de "*M. massiliense*" e que "*M. massiliense*" pode ser um reservatório para esse grupo de plasmídios. Estudos adicionais devem ser realizados para definir se os plasmídios IncP podem ser transferidos por conjugação entre cepas de "*M. massiliense*". Plasmídios IncP possuem usualmente integrons de classe 1 em seu arcabouço. Esses integrons, por sua vez são os mais frequentemente associados a novos genes de resistência, a exemplo dos genes $bla_{NDM}$ (Yong, Toleman et al. 2009).

Plasmídios IncP são encontrados no mesmo nicho ecológico das micobactérias e estão presentes frequentemente em bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose. Considerando a detecção de plasmídios IncP em clones distintos de "*M. massiliense*" em nosso estudo é aceitável supor que a conjugação bacteriana seja o principal mecanismo envolvido na disseminação desse grupo de plasmídios, uma vez que apresentam genes que codificam todo o aparato para conjugação (Popowska and Krawczyk-Balska 2013).

## 6.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade

Atualmente, as recomendações para tratamento empírico de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido são a combinação de claritromicina com um aminoglicosídeo (geralmente amicacina) e alguma outra droga injetável, como cefoxitina ou imipenem (Nessar, Cambau et al. 2012).

Quando analisado a $CIM_{90}$ das amostras em relação à claritromicina após três dias de incubação, verificamos sensibilidade reduzida ou resistência em todos os isolados, indicando que esta droga pode ter sua eficácia diminuída frente a uma infecção por micobactéria de crescimento rápido.

Após reincubação das amostras por 14 dias, observamos que todas apresentam um $CIM_{90}$ ≥32µg/mL, sugerindo um ponto de corte característico de cepas resistentes. Esses achados suportam a combinação de antimicrobianos para o tratamento dessas infecções e contra indicam a monoterapia com claritromicina. Em função da presença desse mecanismo indutivo, o documento M24A do (CLSI) *Clinical and Laboratory Standards Institute* recomenda que todos os isolados da espécie *M. abscessus* sejam reincubados por mais 11 dias, após a leitura inicial de 72h, para avaliação da presença de metilases.

Um fato raro é a resistência à amicacina, um dos antimicrobianos mais utilizados contra essas infecções. Observamos ser uma droga extremamente eficaz contra *M. fortuitum*, pois todos os isolados são sensíveis a ela; entretanto, quando analisamos o perfil de susceptibilidade do Grupo *M. abscessus*, verificamos que 11% dos isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e 29% das amostras de "*M. massiliense*" possuem uma redução na sensibilidade ou resistência a este antimicrobiano. Esse achado é provavelmente decorrente do fato de terem sido incluídas no estudo uma grande quantidade de amostras isoladas do trato respiratório, que correspondem a pacientes cronicamente tratados com esse antimicrobiano.

Outros antimicrobianos utilizados no tratamento destas infecções são as drogas injetáveis imipenem e cefoxitina. Para toda a amostragem utilizada neste estudo, tanto para imipenem quanto para cefoxitina, a taxa de redução da sensibilidade é maior do que 80% em ambos os antimicrobianos. Entretanto no caso de imipenem a incubação por 72 horas e sua consequente degradação interferem no resultado, pois clinicamente este antimicrobiano tem se mostrado eficaz (Griffith, Aksamit et al. 2007).

As amostras do Grupo *M. abscessus* possuem $CIM_{90}$ para ciprofloxacino e moxifloxacino acima do ponto de corte de resistência descrito pelo CLSI (≥4µg/mL), o que caracteriza que estes antimicrobianos não devem ser utilizados empiricamente

no tratamento dessas infecções. Porém, em *M. fortuitum*, os isolados possuem mais de 90% de sensibilidade a estas drogas. Esses achados reforçam a necessidade de estabelecimento de diagnóstico etiológico e de identificação precisa das espécies de micobactérias, além de avaliação do perfil de susceptibilidade (Griffith, Aksamit et al. 2007).

## 6.6 Ensaios de conjugação

A frequência de conjugação, com transferência do plasmídio pBRA100 entre as cepas *Eschericha coli* TOP-Myco e *Eschericha coli* J53 foi de $3{,}7x10^{-9}$. A frequência de conjugação obtida neste estudo é menor do que aquela usualmente observada, de $10^{-4}$, (Shaw and Cabelli 1980) mas confirma o funcionamento do aparato de conjugação codificado no plasmídio pBRA-100 (GenBank CP003505.2). Plasmídios IncP são caracteristicamente conjugativos e são encontrados em uma ampla gama de bactérias ambientais, particularmente bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose. Durante o processo de conjugação de plasmídios, como é o caso daqueles do grupo IncP, que possui operons *tra* e *trb* completos, ocorre a formação da fímbria de transferência, resultando na formação de pequenos agregados contendo 2 a 20 bactérias, permitindo a transferência de material genético. A frequência de conjugação é influenciada por diversos fatores como meio de cultura, temperatura e repouso da suspensão bacteriana, assim como o tamanho do plasmídeo (Andrup and Andersen 1999; Popowska and Krawczyk-Balska 2013).

## 6.7 Ensaios de estabilidade plasmidial em *E. coli*

O experimento de estabilidade plasmidial baseou-se na metodologia desenvolvida por Gelder e colaboradores (Gelder, Ponciano et al. 2007), com modificações realizadas neste trabalho.

Observamos que o plasmídio pBRA-100 é extremamente estável em *E. coli* após 57 subcultivos. Nossos achados confirmam a descrição da literatura quanto à grande estabilidade da maioria dos plasmídios IncP. O principal determinante dessa estabilidade no plasmídio pBRA-100 é, provavelmente, devida à expressão de um sistema toxina-antitoxina, codificado pelos genes *relE* e *dinJ*. Entretanto, há outros fatores, ainda não elucidados que podem interferir na estabilidade desse grupo de plasmídios em bacilos Gram-negativos. Uma das evidências experimentais disponíveis é que a estabilidade pode variar quando a análise é executada por períodos superiores a 30 dias e quando são utilizadas colônias distintas de uma mesma cultura bacteriana (Gelder, Ponciano et al. 2007). Neste estudo, diferentemente de estudos anteriores avaliamos o número total de células que albergam plasmídios em uma cultura líquida e não simplesmente 50 colônias como proposto anteriormente. Usualmente os sistemas de toxina e antitoxina são compostos por duas proteínas, uma toxina e uma protease que a degrada. Como a toxina tem maior estabilidade do que a protease, caso a célula filha perca o plasmídio a toxina consegue atuar e matar a bactéria sem plasmídio. Nossos achados evidenciam que esse tipo de sistema é altamente eficaz no plasmídio pBRA-100 em *E. coli*. Possivelmente essa estabilidade se repete em "*M. massiliense*", uma vez que o mesmo plasmídio foi detectado no mesmo clone em diferentes pontos do território nacional em diferentes datas (Duarte, Lourenco et al. 2009). Nossos estudos quanto à estabilidade do pBRA-100 em "*M. massiliense*", em função do longo período de análise requerido, ainda estão em andamento, mas os dados preliminares indicam grande estabilidade, assim como observado em *E. coli*. (Gerdes, Christensen et al. 2005).

# 7 CONCLUSÕES

→ A substituição S83W (serina – polar → triptofano - apolar) confere resistência ao ciprofloxacino em *Mycobacterium fortuitum*.

→ As substituições nos códons 83, 117 e 154 em isolados do Grupo *M. abscessus* não contribuem para resistência ao ciprofloxacino e ao moxifloxacino.

→ Foram detectados cinco genes *erm* ainda não descritos na literatura: *erm*(45), *erm*(46), *erm*(47), *erm*(48) e *erm*(49).

→ Na amostragem analisada, existe uma estreita correlação entre espécie bacteriana e tipo de gene *erm* detectado, pois os genes *erm*(42) e *erm*(45) foram detectados exclusivamente em *M. abscessus* subsp *bolletii*.

→ Nas espécies *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. fortuitum*, observamos 100% de correlação entre a presença de um gene *erm* e o fenótipo de resistência indutiva à claritromicina.

→ Nas espécies *M. abscessus* subsp. *bolletii* não observamos correlação entre a presença de um gene *erm* e o fenótipo de resistência indutiva à claritromicina.

→ Em *M. abscessus* subsp. *bolletii* não há relação entre a presença do gene e a expressão do fenótipo indutivo, visto que em 52% da amostragem foi observada a presença do gene *erm,* porém, não foram observados altos níveis de resistência a claritromicina após 14 dias de incubação.

→ Propomos a readequação da designação dos genes *erm*(41) descritos por Nash e colaboradores em 2009.

→ Plasmídios IncP foram detectados apenas em isolados pertencentes à espécie "*M. massiliense*", em três grupos clonais distintos denominados ERIC 1, ERIC 2 e ERIC 3.

→ Aproximadamente 11% dos isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e 29% das amostras de "*M. massiliense*" possuem uma redução na sensibilidade ou resistência à amicacina, o que indica a necessidade de realização de testes de sensibilidade para subsidiar o tratamento de infecções causadas por esta espécie.

→ Os isolados do Grupo *M. abscessus* possuem $CIM_{90}$ para ciprofloxacino e moxifloxacino acima do ponto de corte de resistência descrito pelo CLSI (≥4µg/mL), o que caracteriza que estes antimicrobianos não devem ser utilizados para o tratamento de infecções por MCR.

→ O aparato de conjugação do plasmídio pBRA-100 é funcionante e a conjugação entre cepas de E. coli ocorreu na frequência de $3,7x10^{-9}$.

→ O plasmídio pBRA-100 é extremamente estável em *E. coli* após 57 subcultivos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Adekambi, T., P. Berger, et al. (2006). "*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 **56**(Pt 1): 133-143.

Adekambi, T., P. Colson, et al. (2003). "*rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria." J Clin Microbiol **41**(12): 5699-5708.

Adekambi, T. and M. Drancourt (2004). "Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 6): 2095-2105.

Adjei, M. D., T. M. Heinze, et al. (2007). "Acetylation and nitrosation of ciprofloxacin by environmental strains of mycobacteria." Can J Microbiol **53**(1): 144-147.

Aitken, M. L., A. Limaye, et al. (2012). "Respiratory Outbreak of *Mycobacterium abscessus* Subspecies *massiliense* in a Lung Transplant and Cystic Fibrosis Center." Am J Respir Crit Care Med **185**(2): 231-232.

Amato-Neto, V., A. C. Nicodemo, et al. (2007). Antibióticos na Prática Médica. São Paulo, Sarvier.

Andrup, L. and K. Andersen (1999). "A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from *Escherichia coli* and plasmid pCF10 from *Enterococcus faecalis.*" Microbiology **145**(Pt 8): 2001-2009.

ANVISA (2009) "Infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido: Fluxo de Notificações, Diagnósticos Clínico e Microbiológico e Tratamento."

Aydin, F., K. S. Gümüssoy, et al. (2007). "Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR." Journal of Applied Microbiology **103**: 27-35.

Bardouniotis, E., W. Huddleston, et al. (2001). "Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system." FEMS Microbiol Lett **203**(2): 263-267.

Bastian, S., N. Veziris, et al. (2010). "Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group (*M. abscessus, M.*

*massiliense*, and *M. bolletii*) by *erm*(41) and *rrl* sequencing." Antimicrob Agents Chemother.

Basu, J., R. Chattopadhyay, et al. (1992). "Purification and partial characterization of a penicillin-binding protein from *Mycobacterium smegmatis*." J Bacteriol **174**(14): 4829-4832.

Bellinzoni, M., S. Buroni, et al. (2009). "Structural plasticity and distinct drug-binding modes of LfrR, a mycobacterial efflux pump regulator." J Bacteriol **191**(24): 7531-7537.

Bercovier, H., O. Kafri, et al. (1986). "Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome." Biochem Biophys Res Commun **136**(3): 1136-1141.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.

Boettcher, A. K., B. P. Bengtson, et al. (2010). "Breast infections with atypical mycobacteria following reduction mammaplasty." Aesthet Surg J **30**(4): 542-548.

Brown-Elliott, B. A., K. A. Nash, et al. (2012). "Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria." Clinical Microbiology Reviews **25**(3): 545-582.

Brown-Elliott, B. A. and R. J. Wallace, Jr. (2002). "Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria." Clin Microbiol Rev **15**(4): 716-746.

Carattoli, A., A. Bertini, et al. (2005). "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing." J Microbiol Methods **63**(3): 219-228.

Carattoli, A., A. Bertini, et al. (2005). "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing." Journal of Microbiological Methods' **63**: 219-228.

Carson, L. A., N. J. Petersen, et al. (1978). "Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants." Appl Environ Microbiol **36**(6): 839-846.

Cavusoglu, C., I. Soyler, et al. (2007). "Activities of Linezolid against nontuberculous mycobacteria." New Microbiol **30**: 411-414.

Champoux, J. J. (2001). "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism." Annu Rev Biochem **70**: 369-413.

CLSI (2003). "Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard - M24-A." NCCLS **23**(18): 84.

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

Correa, N. E., J. C. Catano, et al. (2010). "Outbreak of mesotherapy-associated cutaneous infections caused by *Mycobacterium chelonae* in Colombia." Jpn J Infect Dis **63**(2): 143-145.

Cox, R. A. and V. M. Katoch (1986). "Evidence for genetic divergence in ribosomal RNA genes in mycobacteria." FEBS Lett **195**(1-2): 194-198.

Daley, C. L. and D. E. Griffith (2010). "Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections." Int J Tuberc Lung Dis **14**(6): 665-671.

Danilchanka, O., M. Pavlenok, et al. (2008). "Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*." Antimicrob Agents Chemother **52**(9): 3127-3134.

De Rossi, E., M. C. Blokpoel, et al. (1998). "Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 1931-1937.

Drage, L. A., P. M. Ecker, et al. (2010). "An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infections in tattoos." J Am Acad Dermatol **62**(3): 501-506.

Duarte, R. S., M. C. Lourenco, et al. (2009). "An Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*." J Clin Microbiol **Accepted**.

Duarte, R. S., M. C. Lourenco, et al. (2009). "Epidemic of postsurgical infections caused by Mycobacterium massiliense." J Clin Microbiol **47**(7): 2149-2155.

Dytoc, M. T., L. Honish, et al. (2005). "Clinical, microbiological, and epidemiological findings of an outbreak of *Mycobacterium abscessus* hand-and-foot disease." Diagn Microbiol Infect Dis **53**(1): 39-45.

Esteban, J., N. Z. Martín-de-Hijas, et al. (2008). "Epidemiology of infections due to nonpigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**: 951-957.

Esteban, J., N. Z. Martin-de-Hijas, et al. (2009). "Prevalence of *erm* methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria." Clin Microbiol Infect.

Esteban, J., N. Z. Martin-de-Hijas, et al. (2009). "Detection of *lfrA* and *tap* efflux pump genes among clinical isolates of non-pigmented rapidly growing mycobacteria." Int J Antimicrob Agents **34**(5): 454-456.

Euzéby, J. P. (2013). List of Prokaryotic Names with Standing in the Nomenclature - Genus *Mycobacterium.* http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html.

Fabrega, A., S. Madurga, et al. (2009). "Mechanism of action of and resistance to quinolones." Microb Biotechnol **2**(1): 40-61.

Flores, A. R., L. M. Parsons, et al. (2005). "Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics." Microbiology **151**(Pt 2): 521-532.

Gelder, L. D., J. M. Ponciano, et al. (2007). "Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship." Microbiology **153**: 452-463.

Gerdes, K., S. K. Christensen, et al. (2005). "Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci." Nature Reviews Microbiology **3**: 371-382.

Gogarten, J. P., W. F. Doolittle, et al. (2002). "Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer." Mol. Biol. Evol. **19**(12): 2226-2238.

Gogarten, J. P. and J. P. Townsend (2005). "Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution." Nature Reviews Microbiology **3**: 679-687.

Goldman, J., F. Caron, et al. (2010). "Infections from tattooing. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* in France." BMJ **341**: c5483.

Gopinath, K. and S. Singh (2010). "Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger?" PLoS Negl Trop Dis **4**(4): e615.

Greendyke, R. and T. F. Byrd (2008). "Differential Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* Variants in Biofilms and Macrophages Compared to That of Planktonic Bacteria." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **52**(6): 2019-2026.

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

Gruger, T., J. L. Nitiss, et al. (2004). "A Mutation in *Escherichia coli* DNA Gyrase Conferring Quinolone Resistance Results in Sensitivity to Drugs Targeting

Eukaryotic Topoisomerase II." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(12): 4495-4504.

Guillemin, I., E. Cambau, et al. (1995). "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 **39**(9): 2145-2149.

Hall, T. A. (1999). "BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.

Hardie, I. D. (1985). "Mycobactericidal efficacy of glutaraldehyde-based biocides." J Hosp Infect **6**(4): 436-438.

Hardy, K. (1986). Bacterial Plasmids. Washington, American Society for Microbiology.

Hofling-Lima, A. L., D. de Freitas, et al. (2005). "In vitro activity of fluoroquinolones against Mycobacterium abscessus and Mycobacterium chelonae causing infectious keratitis after LASIK in Brazil." Cornea **24**(6): 730-734.

Hugonnet, J. E. and J. S. Blanchard (2007). "Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate." Biochemistry **46**(43): 11998-12004.

Hull, S. I., R. J. Wallace, Jr., et al. (1984). "Presence of aminoglycoside acetyltransferase and plasmids in Mycobacterium fortuitum. Lack of correlation with intrinsic aminoglycoside resistance." Am Rev Respir Dis **129**(4): 614-618.

Jacoby, G. A. and P. Han (1996). "Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli.*" Journal of Clinical Microbiology **34**(4): 908-911.

Jain, R., M. C. Rivera, et al. (2002). "Horizontal Gene Transfer in Microbial Genome Evolution." Theoretical Population Biology **61**(4): 489-495.

Jeon, K., O. J. Kwon, et al. (2009). "Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients." Am J Respir Crit Care Med **180**(9): 896-902.

Kasik, J. E. and L. Peacham (1968). "Properties of beta-lactamases produced by three species of mycobacteria." Biochem J **107**(5): 675-682.

Kim, H. Y., B. J. Kim, et al. (2010). "*Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns." Microbiol Immunol. **54**(6): 347-353.

Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nat Rev Microbiol **8**(6): 423-435.

Krishnapillai, V. (1988). "Molecular genetic analysis of bacterial plasmid promiscuity." FEMS Microbiol Rev **4**(3): 223-237.

Kwon, H. H., H. Tomioka, et al. (1995). "Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms." Tuber Lung Dis **76**(2): 141-148.

Leao, S. C., E. Tortoli, et al. (2011). "Proposal that Mycobacterium massiliense and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*." Int J Syst Evol Microbiol **61**(Pt 9): 2311-2313.

Liu, J., H. E. Takiff, et al. (1996). "Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump." J Bacteriol **178**(13): 3791-3795.

Long, K. S., C. Munck, et al. (2010). "Mutations in 23S rRNA at the peptidyl transferase center and their relationship to linezolid binding and cross-resistance." Antimicrob Agents Chemother **54**(11): 4705-4713.

Lorena, N. S., M. B. Pitombo, et al. (2010). "*Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection." Acta Cir Bras **25**(5): 455-459.

Lyu, J., H. J. Jang, et al. (2011). "Outcomes in patients with *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease treated with long-term injectable drugs." Respir Med **105**(5): 781-787.

Macadam, S. A., B. M. Mehling, et al. (2007). "Nontuberculous mycobacterial breast implant infections." Plast Reconstr Surg **119**(1): 337-344.

Miller, J. H. (1992). Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbor.

Monego, F., R. S. Duarte, et al. (2011). "Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil." Braz J Infect Dis **15**(5): 436-441.

Moura, V. C., M. G. Silva, et al. (2012). "Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* recovered from postsurgical infections." J Med Microbiol. **61**: 115-125.

Mukherjee, T., D. Basu, et al. (1996). "Biochemical characterization of the 49 kDa penicillin-binding protein of *Mycobacterium smegmatis*." Biochem J **320 ( Pt 1)**: 197-200.

Mukhopadhyay, S. and P. Chakrabarti (1997). "Altered permeability and beta-lactam resistance in a mutant of *Mycobacterium smegmatis*." Antimicrob Agents Chemother **41**(8): 1721-1724.

Nash, K. A., B. A. Brown-Elliott, et al. (2009). "A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*." Antimicrob Agents Chemother **53**(4): 1367-1376.

Nash, K. A., Y. Zhang, et al. (2005). "Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*." J Antimicrob Chemother **55**(2): 170-177.

Nessar, R., E. Cambau, et al. (2012). "*Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare." J Antimicrob Chemother **67**: 810-818.

Nessar, R., E. Cambau, et al. (2012). "*Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare." J Antimicrob Chemother.

Nguyen, L. and C. J. Thompson (2006). "Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm." Trends Microbiol **14**(7): 304-312.

Norberg, P., M. Bergstrom, et al. (2011). "The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination." Nat Commun **2**: 268.

Ortíz-Pérez, A., N. Martín-de-Hijas, et al. (2011). "Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin." Enferm Infecc Microbiol Clin. **29**(2): 79-84.

Padoveze, M. C., C. M. Fortaleza, et al. (2007). "Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil." J Hosp Infect **67**(2): 161-167.

Pantel, A., S. Petrella, et al. (2012). "Extending GyrB QRDR definition in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing FQ resistance in *M. tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother.

Popowska, M. and A. Krawczyk-Balska (2013). "Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential." Frontiers in Microbiology **4**(44): 1-8.

Quinones, C., E. Ramalle-Gomara, et al. (2010). "An outbreak of *Mycobacterium fortuitum* cutaneous infection associated with mesotherapy." J Eur Acad Dermatol Venereol **24**(5): 604-606.

Ripoll, F., S. Pasek, et al. (2009). "Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*." PLoS One **4**(6): e5660.

Rodrigues, L., D. Sampaio, et al. (2009). "The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex." Int J Antimicrob Agents.

Sambrook, J. J. and D. D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

Sampaio, J. L., E. Chimara, et al. (2006). "Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammaplasty infections." Clin Microbiol Infect **12**(2): 142-149.

Sampaio, J. L., C. Viana-Niero, et al. (2006). "Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates." Diagn Microbiol Infect Dis **55**(2): 107-118.

Sampaio, J. L. M., K. L. Mandelbaum, et al. (2009) "Incompatibility Group P-1 Plasmids Extend Their Host range to *Mycobacterium massiliense*." 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoptherapy.

Sander, P., L. Belova, et al. (2002). "Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations." Mol Microbiol **46**(5): 1295-1304.

Shaw, D. R. and V. J. Cabelli (1980). "R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and fecal strains." Appl Environ Microbiol. **40**(4): 756-764.

Shrivastava, S. M., S. K. Shukla, et al. (2009). "Comparison of antimicrobial efficacy of a fixed dose combination of ceftazidime + sulbactam with ceftazidime and sulbactam alone against five bacteria." Folia Microbiol (Praha) **54**(5): 391-394.

Slater, F. R., M. J. Bailey, et al. (2008). "Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities." FEMS Microbiol Ecol **66**: 3-13.

Smets, B. F. and T. Barkay (2005). "Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines." Nature Reviews Microbiology **3**: 675-678.

Sreevatsan, S., K. E. Stockbauer, et al. (1997). "Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations." Antimicrob Agents Chemother **41**(8): 1677-1681.

Telenti, A., F. Marchesi, et al. (1993). "Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis." Journal of Clinical Microbiology **31**(2): 175-178.

Teng, R. and T. Dick (2003). "Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture." FEMS Microbiol Lett **227**(2): 171-174.

Tenover, F. C. (1995). "Emerging problems in antimicrobial resistance." J Intraven Nurs. **18**(6): 297-300.

Thibeaut, S., P. Y. Levy, et al. (2010). "*Mycobacterium conceptionense* infection after breast implant surgery, France." Emerg Infect Dis **16**(7): 1180-1181.

Thomas, C. M. and C. A. Smith (1987). "Incompatibility Group P Plasmids: Genetics, Evolution, and Use in Genetic Manipulation." Annual Review of Microbiology **41**: 77-101.

Tortoli, E., A. Bartoloni, et al. (2001). "Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory." J Clin Microbiol **39**(11): 4058-4065.

Trias, J., V. Jarlier, et al. (1992). "Porins in the cell wall of mycobacteria." Science **258**(5087): 1479-1481.

Tulkens, P. M. (1991). "Intracellular distribution and activity of antibiotics." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **10**(2): 100-106.

van Klingeren, B. and W. Pullen (1993). "Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers." J Hosp Infect **25**(2): 147-149.

Vester, B. and S. Douthwaite (2001). "Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**(1): 1-12.

Wallace, R. J., Jr., B. A. Brown-Elliott, et al. (2001). "Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria." Antimicrob Agents Chemother **45**(3): 764-767.

Wallace, R. J., Jr., J. M. Musser, et al. (1989). "Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery." J Infect Dis **159**(4): 708-716.

Wallace, R. J., Jr., D. R. Nash, et al. (1985). "Isoelectric focusing of beta-lactamases in *Mycobacterium fortuitum*. Association of a single enzyme pattern with cefoxitin resistance." Am Rev Respir Dis **132**(5): 1093-1097.

Wallace, R. J., Jr., L. C. Steele, et al. (1984). "Susceptibilities of *Mycobacterium fortuitum* biovariant *fortuitum* and the unnamed third biovariant complex to heavy-metal salts." Antimicrob Agents Chemother **26**(4): 594-596.

Yamaguchi, Y., J.-H. Park, et al. (2011). "Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea." Annual Review of Microbiology **45**: 61-79.

Yong, D., M. A. Toleman, et al. (2009). "Characterization of a New Metallo-beta-Lactamase Gene, $bla_{NDM-1}$, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(12): 5046-5054.