

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PERFIL MOLECULAR E DE SUSCETIBILIDADE A CLARITROMICINA DO
COMPLEXO *MYCOBACTERIUM ABSCESSUS***

MAIARA DOS SANTOS CARNEIRO

Porto Alegre, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PERFIL MOLECULAR E DE SUSCETIBILIDADE A CLARITROMICINA DO
COMPLEXO *MYCOBACTERIUM ABSCESSUS*

MAIARA DOS SANTOS CARNEIRO

Dissertação apresentada por Maiara dos
Santos Carneiro para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Porto Alegre, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.04.2016, pela Banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

IPB- Lacer/RS

Prof. Dr. Pedro Silva

Universidade Federal do Rio Grande

dos Santos Carneiro, Maiara
Perfil molecular e de suscetibilidade a claritromicina do Complexo Mycobacterium abscessus / Maiara dos Santos Carneiro. -- 2016.
62 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Resistência a claritromicina. 2. gene erm(41). 3. gene rrl. 4. Complexo Mycobacterium abscessus. I. Luis Barth, Afonso, orient. II. Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

*Dedico este Mestrado aos meus pais, Valdir Antunes
Carneiro e Suzana dos Santos Carneiro, por todo amor,
carinho, compreensão e principalmente incentivo em minhas
escolhas e durante esta caminhada*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre comigo, abrindo portas e colocando pessoas queridas e amigas em meu caminho.

Ao meu orientador, Afonso Luis Barth por todos os ensinamentos, paciência e competência na elaboração deste estudo.

A minha querida coorientadora, Luciana de Souza Nunes por ter me mostrado o caminho da pesquisa, por ter acreditado no meu potencial e me conduzido desde a iniciação científica até o mestrado.

Aos colegas do LABRESIS, pelo apoio, incentivo, aprendizado e conselhos, os quais ajudaram na transposição dos momentos difíceis. Meu agradecimento especial vai para Franciéli Rozales por ter me auxiliado no início dessa caminhada, para Daiana Morales por toda paciência e atenção. Além das alunas de IC Lisiane Rech, Tatiane Soldi e Marina Niada pela amizade e parceria dentro e fora do laboratório.

As minhas amigas de graduação, Jéssica Meyer e Camila Wilhelm que sempre estiveram presentes nos momentos de ansiedade e estresse, amenizando preocupações e angustias com palavras amigas ou somando alegrias em momentos de descontração.

Ao CNPq e Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio financeiro a minha pesquisa e pela bolsa de mestrado.

Aos meus pais Valdir e Suzana Carneiro, os quais são meus maiores incentivadores na busca do conhecimento, a vitória desta conquista também se deve a eles, pois sempre estiveram ao meu lado acreditando nos meus sonhos, compreendendo a ausência e fornecendo suporte em momentos difíceis, apesar dos quilômetros de distância.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que de uma maneira ou outra compartilharam comigo esse momento de grande crescimento pessoal e aprendizado e que contribuíram para que esse percurso chegasse ao final.

“A mente que se abre a uma nova
ideia, jamais voltará ao seu tamanho
original”

(Albert Einstein)

Resumo

Claritromicina era considerada um antibiótico de escolha para infecções causadas pelo complexo *Mycobacterium abscessus*, entretando, recentemente falhas no tratamento com este antibiótico têm sido reportadas. A resistência adquirida a claritromicina está relacionada à mutações pontuais que acarretam substituição da adenina na posição 2058 ou na posição 2059 na região do gene *rrl* que codifica o domínio peptidil transferase do rRNA 23S. Um mecanismo secundário de resistência à claritromicina tem sido descrito como resistência induzida, que é conferida pelo polimorfismo T/C no nucleotídeo 28 do gene *erm(41)*. A resistência adquirida pode ser detectada em até 3 dias de incubação do *M. abscessus* com a claritromicina enquanto que a resistência induzida requer mais do que 5 dias de incubação. Por outro lado, o uso de marcadores moleculares para detecção de resistência adquirida e induzida no complexo *M. abscessus* têm sido propostos. O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de suscetibilidade e os marcadores moleculares de resistência à claritromicina no complexo *M. abscessus*. Um total de 42 isolados de um estudo prévio de vigilância, entre os anos 2007 e 2013 foram utilizados. O perfil de suscetibilidade para a claritromicina foi determinado por microdiluição em caldo com leituras em 3, 5, 7 e 14 dias. Mutações nos genes *rrl* e *erm(41)* foram avaliados por PCR com primers específicos e posterior sequenciamento. Resistência à claritromicina, em até 3 dias de incubação, foi observada em 31 dos 42 (73,8%) isolados. Resistência induzida à claritromicina foi observada em 6 de 11 (54,5%) isolados que apresentaram resistência após 5 ou 7 dias de incubação. Todos os isolados com resistência induzida foram *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Além disso, todos os 28 isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* apresentaram deleção em *erm(41)*. Apenas cinco isolados foram sensíveis à claritromicina após 14 dias de incubação. Nenhum dos 42 isolados apresentaram mutação pontual na região de peptidil transferase do rRNA 23S e todos os isolados apresentaram o polimorfismo T/C no nucleotídeo 28 do gene *erm(41)*. Os dados deste estudo indicam a falta de correlação dos marcadores moleculares com a expressão de resistência à claritromicina.

Palavras-chaves: Claritromicina, resistência induzida, resistência adquirida, gene *erm(41)*, gene *rrl*

Abstract

Molecular and susceptibility profile of clarithromycin in *M. abscessus*

Infections due to *Mycobacterium abscessus* complex used to respond to clarithromycin treatment but more recently treatment failure with this antibiotic has been reported. Acquired resistance to clarithromycin is related to substitutions at the adenine either at position 2058 or at position 2059 in a region of the *rrl* gene encoding to the peptidyltransferase domain of the 23S rRNA. A secondary mechanism related to clarithromycin resistance has been described as an inducible resistance, conferred by T/C polymorphism at the 28th nucleotide in *erm(41)* gene. Acquired resistance can be detected up to 3 days of incubation of the *M. abscessus* with the clarithromycin while inducible resistance requires more than 5 days of incubation. Molecular markers to detect acquired and inducible resistance in *M. abscessus* complex isolates were proposed. This study evaluated the profile of susceptibility and the molecular markers of clarithromycin resistance in *M. abscessus* complex. A total of 42 isolates from a previous surveillance study (2007 to 2013) were used in this study. The susceptibility profile for clarithromycin was determined by broth microdilution with reads at 3, 5, 7 and 14 days. Mutations in *rrl* and *erm(41)* genes were evaluated by PCR with specific primers followed by sequencing. Clarithromycin resistance, up to 3 days of incubation, was observed in 31 of 42 (73.8%) isolates. Inducible clarithromycin resistance was observed in 6 of 11 (54.5%) isolates which presented resistance only after 5 or 7 days of incubation. All isolates with inducible resistance were identified as *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Moreover, all 28 *M. abscessus* subsp. *massiliense* had a deletion in *erm(41)*. Only five isolates proved to be susceptible to clarithromycin after 14 days of incubation. None of the 42 isolates presented a point mutation in the peptidyltransferase region of the 23S rRNA (*rrl*) and all isolates presented the T/C polymorphism at the 28th nucleotide of the *erm(41)* gene. The data of this study indicates a lack of correlation of molecular markers of clarithromycin resistance for both acquired and inducible resistance to clarithromycin.

Keywords: Clarithromycin, inducible resistance, acquired resistance, *erm(41)* gene, *rrl* gene

Lista de tabelas

Tabela 1: Pagenicidade das MNT.....	18
Tabela 2: Características do gene <i>erm</i> (41).....	27

Lista de figuras

Figura 1: Membrana celular micobacteriana.....	16
--	----

Lista de Abreviaturas

BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMA	Complexo <i>M. avium</i>
CMT	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
IPB-LACEN	Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MDR	Multidroga Resistente
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
QRDR	<i>Quinolone-Resistance-Determining Regions</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Micobactérias não Tuberculosas	17
2.2 Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR)	19
2.2.1 <i>Infecção por MCR</i>	20
2.2.2 <i>Tratamento</i>	21
2.2.3 <i>Teste de suscetibilidade para MCR</i>	22
2.2.4 <i>Resistência aos fármacos</i>	22
2.2.5 <i>Resistência a Claritromicina no complexo M. abscessus</i>	24
2.2.6 <i>Resistência Adquirida a Claritromicina</i>	25
2.2.7 <i>Resistência Induzida a Claritromicina</i>	26
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4 OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivo Principal	39
4.2 Objetivos Secundários	39
5. ARTIGO CIENTÍFICO	41
6. CONCLUSÕES GERAIS	55
7. ANEXOS	57
7.1 ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	57
7.2 ANEXO II - Folha de Rosto Plataforma Brasil	62

1. INTRODUÇÃO

O crescente número de publicações científicas abordando infecções causadas por espécies do complexo *Mycobacterium abscessus* sugere que estes microrganismos podem ser considerados patógenos emergentes, sendo responsáveis por surtos em todo o mundo. A frequência progressiva do aparecimento de *M. abscessus*, na rotina laboratorial e clínica denota a importância que tais micobactérias vêm assumindo no decorrer dos anos em nossa comunidade, demonstrando assim a importância de investigação das cepas pertencentes ao complexo *M. abscessus* presentes em nosso Estado.

O complexo *M. abscessus* é considerado o mais patogênico e multidroga resistente (MDR) entre as Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR). As infecções causadas pelo complexo *M. abscessus* são difíceis de tratar já que este grupo de micobactérias são intrinsecamente resistentes não só aos tuberculostáticos clássicos, mas também a maioria dos antibióticos atualmente disponíveis. A claritromicina foi a droga de escolha para o tratamento dessas infecções, até que falhas terapêuticas começaram a ser relatadas.

A resistência adquirida a claritromicina está relacionada com mutações pontuais em uma região do gene *rrl*, que codifica o domínio peptidil transferase do rRNA 23S, enquanto que a resistência induzida é devido a um polimorfismo T/C no nucleotídeo 28 do gene *erm(41)*.

Este estudo teve como objetivo avaliar as mutações pontuais e polimorfismos dos genes envolvidos na resistência adquirida e induzida a claritromicina, e sua correlação com o perfil de suscetibilidade *in vitro* do complexo *M. abscessus*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A família *Mycobacteriaceae*, que faz parte da ordem *Corynebacteriales*, possui um único gênero, o *Mycobacterium*, o qual é composto por um número crescente de novas espécies. Atualmente existem mais de 169 espécies de Micobactérias não Tuberculosas (MNT) e 13 subespécies reconhecidas oficialmente (1), sendo que 1/3 destas estão associadas à doença no homem e no animal (2,3).

Estudos taxonômicos demonstraram similaridades fenotípicas e homologia do DNA entre as várias espécies das micobactérias descritas, sendo que muitas espécies são agrupadas em complexos e grupos (4).

O gênero *Mycobacterium* é composto por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* – BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*); pelo *M. leprae* e por outras espécies conhecidas como Micobactérias não Tuberculosas (MNT). Entre as MNT se destacam três importantes grupos: 1) O Complexo *M. avium* (CMA) que é composto pelas espécies *M. avium* subsp. *avium*, subsp. *silvaticum*, subsp. *hominissuis*, e subsp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bouchedurhonense*, e *M. ituriense* (5); 2) O Complexo *M. terrae* que agrupa as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale* (6) e 3) o Grupo *M. chelonae*, composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. boletti*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* (6,7,8).

As micobactérias constituem um grupo de microrganismos com distintas características de metabolismo, crescimento, nicho ambiental, epidemiologia, patogenicidade, distribuição geográfica e associação com doenças (6).

A formação das colônias de micobactérias geralmente é mais lenta do que das demais bactérias, essa lentidão deve-se ao fato da menor taxa de absorção de nutrientes, provavelmente devido a espessura da membrana celular (Figura 1). Portanto a visualização de colônias em meios de cultura sólido, quando incubados em temperatura ótima, ocorre apenas após dois a vinte dias. As colônias de micobactérias apresentam diferentes tipos de coloração variando de rosa ao amarelo/laranja (9).

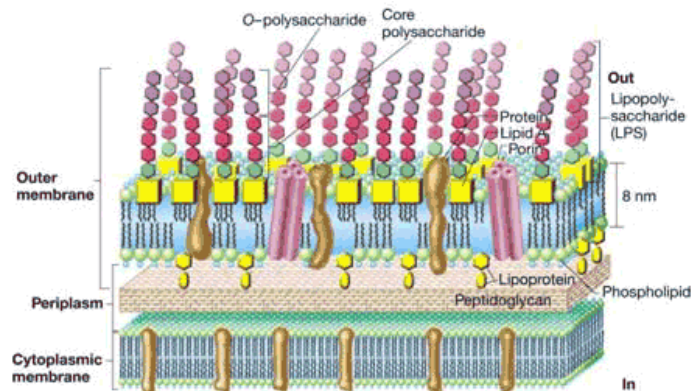


Figura 1: Membrana celular micobacteriana (10)

As micobactérias têm forma bacilar, são aeróbias, têm alto conteúdo G+C (62 a 70%) e a característica fundamental para definição do gênero *Mycobacterium* é sua propriedade de resistência à descoloração com álcool ácido, por isso denominadas bacilos álcool ácido resistentes (BAAR). Essa propriedade se dá devido a grande quantidade de lipídeos localizados na parede celular do microrganismo sendo uma característica que difere o gênero *Mycobacterium* da maioria das demais bactérias. Apesar de não se corarem integralmente pelo método de Gram, são consideradas gram-positivas. As MCR formam colônias visíveis a olho nu em até sete dias, quando incubadas em meio sólido. As Micobactérias de Crescimento Lento (MCL) apresentam crescimento após 7 dias de incubação (2). A temperatura ideal de crescimento é variável de acordo com a espécie, e oscila numa faixa de 25°C a 45°C. A maioria das espécies é capaz de crescer em meios simples contendo aminoácidos, glicerol e sais minerais, mas algumas requerem suplementos, a exemplo de *M. haemophilum* que requer hemina (4).

2.1 Micobactérias não Tuberculosas

As mais de 150 espécies reconhecidas como MNT compartilham características comuns: 1) são patógenos facultativos; 2) não existe evidência de transmissão direta; 3) algumas espécies de MNT são ubiqüitárias e outras têm distribuição mais restrita; e 4) o tratamento pode ser difícil e varia de acordo com a interação patógeno-hospedeiro e local acometido pela doença. As MNT incluem espécies de crescimento lento e crescimento rápido (5).

Diferentemente das espécies que integram o complexo *M. tuberculosis*, as MNT encontram-se dispersas na natureza e apresentam patogenicidade variável (11,12, 13), podem ser isoladas de fontes diversas, como: solo, poeira, pedras, bioaerossóis, água natural, água potável, animais e até mesmo da microbiota epidérmica, trato respiratório e intestinal dos seres humanos (3, 14, 15). As MNT apresentam extraordinária capacidade de sobrevivência, sendo que o que facilita sua ubiqüidade é a capacidade de adaptação ao ambiente hostil, como com poucos nutrientes, baixo pH e temperaturas extremas (15).

É provável que o número de novas espécies de MNT continue a expandir-se rapidamente. Esse aumento pode ocorrer em função da maior sensibilidade de técnicas moleculares, como o sequenciamento do DNA que é altamente confiável e pode fornecer novos perfis de micobactérias, que anteriormente eram classificadas dentro de grandes grupos de acordo com as características fenotípicas ou bioquímicas (5).

Muitas espécies de micobactérias são saprófitas, podendo causar doença em determinadas situações, (bactérias oportunistas) (12), tanto no homem e no animal. Infecções por MNT são denominadas genericamente de micobacterioses, independentemente da espécie causadora da doença (7, 9).

Com base em critérios clínicos as MNT são divididas em dois grupos. O primeiro grupo consiste em MNT que se encontram na natureza e que sob certas circunstâncias podem se tornar patogênicas (potencialmente patogênicas). O segundo grupo inclui as micobactérias saprófitas ou não patogênicas ou ainda excepcionalmente patogênicas (tabela 1) (9, 16).

Tabela 1: Patogenicidade das MNT

POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS	RARAMENTE PATOGÊNICAS	
	<i>M. agri</i>	<i>M. lentiflavum</i>
	<i>M. aichiense</i>	<i>M. lepraemurium</i>
	<i>M. alvei</i>	<i>M. madagascariense</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. culum</i>	<i>M. margeritense</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. austroafrican</i>	<i>M. moriokaense</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. mucogenicum</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. brumae</i>	<i>M. neoaurum</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. nonchromogeni</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. clorophenolic</i>	<i>M. obuense</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. parafortuitum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. confluentis</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. porcinum</i>
<i>M. malmoense</i>	<i>M. cookii</i>	<i>M. poriferae</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. duvalli</i>	<i>M. rhodesiae</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. senegalense</i>
<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. sphagni</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. szulgai</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. thermoresis</i>
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. triplex</i>
	<i>M. holderi</i>	<i>M. triviale</i>
	<i>M. interjectum</i>	<i>M. vaccae</i>
	<i>M. komossense</i>	

Fonte: Brasil (2008)

As provas fenotípicas classificam as MNT em quatro grupos, baseados em duas características: 1) produção de pigmentos carotenóides que podem variar de laranja a amarelo intenso (9); 2) tempo de crescimento em meio de cultura; rápido, se ocorrer a produção de colônias visíveis antes de sete dias, lento, se ocorrer em sete dias ou mais (9,17,18).

As micobacterioses não são doenças transmitidas de forma direta, por isso não há a obrigatoriedade de notificação, não permitindo o acompanhamento do quadro epidemiológico da doença (3, 9). Entretanto, diante da necessidade de consolidação de um perfil epidemiológico e sanitário dos surtos ocorridos e das proporções de cada evento, fez-se necessário a obrigatoriedade de padronização de notificações para MCR, para todas as instituições, por profissionais de saúde pública ou privada, de casos de infecção em sítio cirúrgico (19).

2.2 Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR)

As espécies de MCR foram subdivididas em três grupos:

- 1) Grupo *M. fortuitum*, composto pelas espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. bonickei*;
- 2) Grupo *M. chelonae*, composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. bolletii*, e *M. salmoniphilum*,
- 3) Grupo *M. smegmatis*, composto pelas espécies *M. smegmatis*, *M. wolinskyi* e *M. goodii* (20).

O *M. chelonae* e o *M. abscessus* são espécies anteriormente enlobadas no grupo *M. chelonae-abscessus*. Antes de 2001, apenas as espécies *M. chelonae* e *M. abscessus*, eram reconhecidas como membros desse grupo. Depois do ano 2001, quatro novas espécies foram adicionadas: *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. bolletii*, e *M. salmoniphilum* (20). O *M. abscessus* foi descrito por Moore e Frerichs em 1953 (21), no entanto, apenas após sua separação do grupo *M. chelonae-abscessus* que o *M. abscessus* foi reconhecido como um importante agente patogênico humano (12).

A taxonomia do complexo *M. abscessus* é complexa e ainda não resolvida. Em 2011, *M. bolletii* e *M. massiliense* foram classificados como uma única subespécie (*M. abscessus* subsp. *bolletii*) por conta de sua baixa diversidade genética; em 2013, a análise de dados de sequenciamento de nova geração de genoma completo permitiu a diferenciação do complexo *M. abscessus* em 3 subespécies: *M.*

abscessus subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *massiliense* (22).

A frequência de infecções por MCR é crescente e cada vez mais esses organismos têm sido reconhecidos como patógenos, sendo o *M. chelonae* e o *M. abscessus* as espécies mais patogênicas entre as MCR (23).

A ubiquidade dessas espécies no ambiente, particularmente em água e ambientes úmidos, contribui para o fato de que as espécies *M. chelonae* e *M. abscessus*, sejam as mais prevalentes em infecções oportunistas em seres humanos. Essas infecções são usualmente relacionadas à infusão de soluções aquosas, ou exposição de sítios estéreis a água contaminada com micobactérias (24, 25).

As MCR são difíceis de erradicar com técnicas de descontaminação comuns. A parede celular rica em ácidos micólicos das MCR denota ao microrganismo uma relativa resistência à agentes desinfetantes, tais como o cloro, glutaraldeído e formaldeído, pois dificulta a penetração da solução na matriz extracelular (8, 26). Além disso, as MCR têm a capacidade de formar biofilmes, que é uma estratégia bem sucedida de sobrevivência para estes organismos (27).

A frequente presença desses microrganismos em reservatórios de água em hospitais, a relativa resistência a biocidas, a habilidade de crescer em água destilada, e a formação de biofilmes, fazem com que as MCR sejam uma ameaça de surtos em hospitais (26, 27, 28, 29).

2.2.1 Infecção por MCR

A não evidência de transmissão direta tem levado a proposição que a infecção por MCR ocorre a partir de fontes ambientais bem como de artigos médicos inadequadamente esterilizados (5, 30). Micobacterioses posterior à procedimentos invasivos (como videolaparoscopia, cirurgia oftálmica a laser, cirurgia cardíaca, plástica facial, acupuntura, lipoaspiração, próteses de silicone, mamoplastias, etc.) têm sido documentadas, acometendo principalmente a pele e tecido subcutâneo do paciente (28, 29).

A infecção causada por MCR devido a presença de cateteres de acesso venoso de longa permanência tem sido cada vez mais relatada, sendo *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* e *M. mucogenicum* os microrganismos mais comuns (27).

A síndrome clínica das micobacterioses por MCR é variável e a patologia é não específica (31). A doença pode envolver vários tecidos e órgãos, como pele (32, 33, 34), linfonodos (35), pulmão (36, 37, 38), ossos (39), olhos (40, 41), podendo também causar infecção disseminada. Muitos pacientes são imunossuprimidos ou têm doença crônica, aumentando o risco para infecção por MCR. O curso da infecção é altamente variável (42). As principais características da infecção são a formação de abscessos, nódulos, ulcerações, além da falência de resposta ao tratamento de infecções de sítio cirúrgico (43).

2.2.2 Tratamento

A grande concentração de lipídios na parede celular das MCR é responsável pela resistência que os anticorpos encontram para debelar a infecção. A parede celular das MCR é rica em ácido micólico, o qual apresenta resistência às enzimas solúveis em água; aos antibióticos e aos desinfetantes (12).

As espécies de MCR podem apresentar diferenças no perfil de sensibilidade aos fármacos, assim o tratamento para estes organismos deveria se basear na suscetibilidade *in vitro*. Identificação em nível de espécie é importante, porque há padrões de suscetibilidade antimicrobiana previsíveis conforme diferentes espécies. Em geral, tobramicina pode ter atividade contra *M. chelonae*. *M. abscessus* tipicamente mostra suscetibilidade a aminoglicosídeos, a tigeciclina, amicacina, cefoxitina, imipenem, claritromicina e azitromicina (44). O *M. fortuitum* tende a ser inibido por tetraciclina, sulfametoxazol e quinolonas e *M. chelonae* é frequentemente inibido por macrolídeos, linezolida e tobramicina (12). Além disso, a claritromicina tem sido recomendada como primeira linha de antimicrobianos para o tratamento da doença pulmonar causada pelo *M. abscessus* subsp. *abscessus* (12). No entanto estudos têm demonstrado que o *M. abscessus* subsp. *bolletii* é altamente resistente a claritromicina (45).

O uso de monoterapia para MCR não é recomendado, especialmente quando há uma grande carga de microrganismos. Bons resultados clínicos têm sido demonstrados quando os macrolídeos são combinados com pelo menos uma droga complementar a que o microrganismo tenha suscetibilidade *in vitro* (12). Por exemplo, um aminoglicosídeo (geralmente amicacina) e uma outra de droga injetável, como cefoxitina ou imipenem apresentam melhor efetividade terapêutica do que a monoterapia no tratamento de infecções por MCR (44).

2.2.3 Teste de suscetibilidade para MCR

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) apresenta padronização para o teste de suscetibilidade de micobactérias, *Nocardia* e outros actinomicetos aeróbios. O documento CLSI M24-A2 (2011) recomenda que o teste de suscetibilidade das MCR seja realizado através de microdiluição em caldo (46).

As recomendações descritas para MCR são baseadas em dados de estudos que incluem grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. O teste de suscetibilidade é indicado para MCR que são consideradas clinicamente relevantes, como por exemplo, isoladas do sangue, tecido, pele e outros tecidos (12, 46).

Os antimicrobianos que podem ser testados para MCR são: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolida, moxifloxacino, sulfametoxazol-trimetoprim e tobramicina (12, 46).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para testes de suscetibilidade de MCR não pode ser realizada em meios sólidos, devido à inconsistência dos resultados (12).

2.2.4 Resistência aos fármacos

Embora as micobacterioses sejam doenças curáveis, a terapia necessária para a obtenção da cura é longa, além de apresentar risco de toxicidade e efeitos adversos, o que favorece a não adesão do paciente ao tratamento, proporcionando

assim, a seleção de bactérias resistentes as drogas. Aliado a este fator, a prescrição errônea do fármaco e o uso de monoterapia, também podem selecionar cepas resistentes (12).

A resistência a antibióticos pelas MCR pode ser natural ou adquirida, a primeira ocorre devido ao envelope altamente hidrofóbico que atua como uma barreira física e química para muitos compostos (47). Os β -lactâmicos, por exemplo, têm capacidade reduzida de cruzarem o envelope celular e penetrar nas MCR.

Quanto a resistência adquirida, não há relatos de genes introduzidos por elementos genéticos transponíveis, tais como plasmídeos e transposons mas por mutação espontânea de genes-alvo em resposta à presença de antibióticos, decorrente do desenvolvimento de mecanismos de defesa. Algumas espécies de MCR podem adquirir mutações genéticas aleatoriamente ou sofrer mudanças na permeabilidade da membrana, fatores que podem resultar em resistência aos antimicrobianos (47).

Os determinantes de resistência codificados pelo genoma, incluem enzimas hidrolíticas ou modificadoras de droga, como por exemplo, a produção da enzima rifampicina ADP-ribosiltransferase, que pode estar envolvida na resistência a rifampicina por *M. abscessus*. O complexo *M. abscessus* também possui enzimas que podem modificar aminoglicosídeos, transferindo resíduos acetil ou fosfato tornando o antibiótico inativo (48, 49).

As espécies pertencentes ao complexo *M. abscessus* possuem apenas um operon em seu genoma, o que favorece o desenvolvimento de resistência aos fármacos devido a ocorrência de mutações que são expressas fenotipicamente. A resistência aos aminoglicosídeos, por exemplo, decorre de uma única mutação que afeta o 16S rRNA, sendo a adenina substituída por uma guanina na posição 1408 (A1408G), que é responsável pela resistência a amicacina e tobramicina (50). Outro exemplo de polimorfismo genético conferindo resistência a drogas, tem sido observado em quinolonas. Estudos têm sido realizados nas sequências de regiões conservadas, denominadas *quinolone-resistance-determining regions* (QRDR) nas subunidades do DNA girase GyrA e GyrB e foi mostrado que a presença de alanina na posição 83 dentro do QRDR GyrA e arginina e asparagina nas posições 447 e

464, dentro de QRDR GyrB podem conferir resistência às quinolonas em *M. abscessus* (51).

As bombas de efluxo representam um dos determinantes de resistência aos antibióticos no complexo *M. abscessus*, tais micobactérias codificam proteínas membros da família dos transportadores ABC e proteína de membrana micobacteriana (MmpL) (52).

As espécies pertencentes ao Complexo *M. abscessus* podem apresentar variabilidade de resistência aos antibióticos, indicando que a determinação do perfil de suscetibilidade dos isolados deveria ser realizada sempre. (53, 54).

2.2.5 Resistência a Claritromicina no complexo *M. abscessus*

O complexo *M. abscessus* é considerado entre as MCR o mais patogênico e multidroga resistente (MDR) (55, 56). As infecções causadas pelo complexo *M. abscessus* são difíceis de tratar já que este grupo de micobactérias são intrinsecamente resistentes não só aos anti tuberculostáticos clássicos, mas também a maioria dos antibióticos atualmente disponíveis (7).

Na década de 1990, a claritromicina tornou-se o fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas pelo complexo *M. abscessus* (7), até que a resistência foi relatada e falhas no tratamento com este antibiótico foram descritas (12, 22). A claritromicina tem sido usada como monoterapia ou em combinação com outras drogas, particularmente amicacina e cefoxitina (57, 58, 59).

A claritromicina representa outra classe de antibióticos que visam o rRNA operon, impedindo a peptidil transferase de adicionar um grupo peptidil no tRNA do próximo aminoácido, assim inibindo a translocação ribossomal (60).

O uso generalizado de macrolídeos na assistência médica criou condições favoráveis para a seleção de isolados resistentes do complexo *M. abscessus* (61). Os dois principais mecanismos de resistência a macrolídeos são bombas de efluxo de fármacos e modificação do local alvo da droga no ribossomo (55, 62).

Mecanismos de resistência bacteriana têm sido bem caracterizados para uma ampla gama de bactérias há muitos anos (63), no entanto, os mecanismos de resistência a claritromicina para o complexo *M. abscessus* foram descritos há menos de dez anos. Acreditava-se que a resistência à claritromicina era causada por dificuldades na permeabilidade envolvendo a natureza especial da parede celular das micobactérias, além da inativação de antibióticos, bombas de efluxo e componentes ribossomais mutados (proteínas ribossomais ou 23S) (64). No entanto, a detecção de uma *erm* metilase (*erm*(41)) alterou este ponto de vista (22, 53).

Relatos de resistência a claritromicina têm sido documentados em todo mundo, como por exemplo na China, Australia, Coreia, Ásia e também no Brasil (65, 66, 67, 68, 69).

2.2.6 Resistência Adquirida a Claritromicina

A resistência adquirida a claritromicina tem sido sugerida como uma explicação para a falta de eficácia nos tratamentos com claritromicina frente as infecções pelo complexo *M. abscessus* (70).

O mecanismo mais comum de resistência adquirida aos macrolídeos em bactérias clinicamente importantes é a presença de uma metilase 23S rRNA, sendo que a resistência é conferida pela transferência de um ou dois grupos metil para um resíduo de adenina na região peptidil transferase do rRNA 23S (71).

A resistência adquirida a claritromicina no complexo *M. abscessus* está relacionada com mutações pontuais na adenina nas posições 2058 ou 2059 de uma região do gene *rrl* que codifica para o domínio peptidil transferase do 23S (70).

Em estudo recente foi relatada uma mutação adquirida na posição 2057 do gene *rrl*, capaz de conferir resistência adquirida de baixonível à claritromicina (72). É importante enfatizar que as mutações na posição 2057 do gene *rrl* em outros microrganismos estão relacionados com a baixos níveis de resistência à claritromicina *in vitro*. Vester et al, também relataram mutações nas posições 2057 e 2611 do gene *rrl* causado resistência a claritromicina devido à sua proximidade ao centro da ação. As mutações nestas posições (2057 e 2611) são capazes de

obstruir a ligação do antibiótico ao seu alvo, e fazer com que a resistência de baixo nível aos macrólidos seja desencadeada (73).

A resistência adquirida a claritromicina nos isolados pertencentes ao complexo *M. abscessus* varia entre 2,7% a 28,6% (74), e esta resistência pode ser detectada em até 3 dias de incubação do *M. abscessus* com a claritromicina (75).

2.2.7 Resistência Induzida a Claritromicina

Um gene denominado eritromicina metilase ribossômica (*erm*) foi identificado em vários isolados de MCR e a presença desse gene foi associado com resistência induzida a claritromicina (76, 77). Em 2006, Nash et al., evidenciou genes *erm* em sete espécies de MCR: *M. boenickei*, *M. goodii*, *M. houstonense*, *M. mageritense*, *M. neworleansense*, *M. porcinum*, e *M. wolinskyi* (64). Em 2009, Esteban et al., evidenciou a presença do gene *erm* também em isolados do complexo *M. abscessus* (78). Como mencionado, micobactérias são repletas de metilases que conferem resistência aos macrolídeos, sendo divididas em cinco classes de *erm*: *erm*(37) do complexo *M. tuberculosis* (79, 80), o *erm*(38) do grupo *M. smegmatis* (81, 82), *erm*(39) do grupo *M. fortuitum* (64, 83), *erm*(40) de *M. mageritense* e *M. wolinskyi* (64) e *erm*(41) do complexo *M. abscessus* (22, 53).

A presença deste gene com expressão variável conferida pelo polimorfismo T/C no nucleotídeo 28 do gene *erm*(41) é, provavelmente, responsável pelo mecanismo de resistência induzida (que necessita de pelo menos 5 dias de incubação do *M. abscessus* com a claritromicina para ser detectado) (22, 64, 84).

A literatura indica que as subespécies pertencentes ao complexo *M. abscessus* diferem em relação ao gene *erm*(41), sendo que diferentes subespécies apresentam características do gene *erm* que são específicas e padrões de susceptibilidade diferentes à claritromicina. O *M. abscessus* subs. *massiliense*, era conhecido por conter o gene *erm*(41) truncado e não-funcional e, por isso, ser sempre sensível à claritromicina. Por outro lado, o *M. abscessus* subs *abscessus* contém um gene *erm* completo mas que pode apresentar polimorfismo T28 (associado com a resistência à claritromicina), ao passo que, o polimorfismo C28 é associado com a suscetibilidade

a claritromicina (54). Bastian et al, relataram que uma única troca de nucleótidos, T28C (Trp-Arg→10), no gene *erm(41)* é capaz de causar uma perda de atividade da metilase em isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, resultando num fenótipo suscetível a claritromicina. O *M. abscessus* subsp. *bolletii*, contém o gene *erm(41)* com o nucleotídeo T28, e foi demonstrado ser resistente a claritromicina (Tabela 2) (53).

Em estudo realizado na Coreia por Kim et al, em 2016, foi realizada a identificação das subespécies do complexo *M. abscessus* pelo sequenciamento de ambos genes *hsp65* e *erm(41)*, sendo o último considerado espécie-específico (67). Na verdade, na literatura já era consolidado que a presença do gene *erm(41)* truncado identificava a espécie *M. abscessus* subsp. *massiliense* (53, 72). No entanto, em estudo recente foi observada a presença de um isolado de *M. abscessus* subsp. *bolletii* com o gene *erm(41)* truncado. Além disso vários casos de *M. abscessus* subsp. *massiliense* com o gene *erm(41)* funcional têm sido relatados (85). Isso evidencia a necessidade de cuidado ao usar apenas o sequenciamento de *erm(41)* para identificar subespécies de *M. abscessus* (72). Estes achados suportam as evidências que a transferência genética e recombinação ocorre entre subespécies (22, 86).

Tabela 2: Características do gene *erm(41)*

Espécie	Nucleotídeo 28	Integridade do gene <i>erm(41)</i>	Perfil de suscetibilidade
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	T ou C	Sem deleção	Variável
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	T	Geralmente sem deleção	Geralmente resistente
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	T	Geralmente com deleção	Geralmente sensível

Fonte: Adaptado de Bastian S., et al (2011)

A metilase codificada pelo gene *erm(41)* é capaz de impedir a ligação do antibiótico ao ribossomo por mono ou dimetilação que altera a forma e composição química do local de ligação da droga, reduzindo assim, a afinidade da claritromicina ao ribossomo (87, 88, 89). A modificação da estrutura química do ribossomo por

erm(41), aparentemente não é favorável para a célula, a menos que a claritromicina esteja presente. Por este fato, a ligação e modificação do ribossomo é realizada apenas quando for absolutamente necessária, logo, a expressão do gene *erm(41)* é altamente regulada, sendo induzida apenas na presença de claritromicina, pois está associada a altos custos energéticos para a célula (90).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Euzéby JP. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium*. 2014. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em: fevereiro 2016
2. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO, 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. 2004; 17(1):98-106.
3. Falkinham JO. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. **Future microbiology**. 2010; 5(6):951-60.
4. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2002; 99(6):3684-9.
5. Falkinham JO, 3rd. Ecology of nontuberculous mycobacteria-where do human infections come from? **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. 2013;34(1):95-102.
6. Roth A, Reischl U, Streubel A, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. **Journal of Clinical Microbiology**. 2000;38(3):1094-104.
7. Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. 2002;15:716-746.
8. Pitombo MB, Lupi O, Duarte RS. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 2009;31:529-533.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento e Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1ª ed: Brasília; 2008.
10. Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiologia Médica. 26ª ed: 2014.

11. Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. 1996;9(2):177-215.
12. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2007;175:367–416.
13. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**. Rev. 2003;16:319-354.
14. Carson LA, Petersen NJ, Favero MS, et al. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**. 1978;36:839–846.
15. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**. 2006;42(12):1756-1763.
16. Chan ED, Iseman MD. Underlying host risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. 2013; 34(1):110-23.
17. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Medical Clinics of North America**. 1959;43(1):273-90.
18. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology – Organization and Practice. 2^a ed. Butterworth-Heinemann, Oxford; 1997.
19. ANVISA. Relatório Descrito de Investigação de Casos de Infecções por Micobactérias Não Tuberculosas de Crescimento Rápido (MCR) no Brasil no Período de 1998 a 2009. In: Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGES, 2011.
20. Simmon KE, Brown-Elliott BA, Ridge PG, et al. *Mycobacterium chelonae* – *abscessus* complex associated with sinopulmonary disease. **Emerging Infectious Diseases**. 2011;17(9):1692–1700.
21. Moore M, Frerichs JB. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a

study of the organism, *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Investigative Dermatology**. 1953; 20:133–69.

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

23. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2009;53(4):1367-76.

24. Meyers H, Brown-Elliott BA, Moore D, Curry J, et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. **Clinical Infectious Diseases**. 2002; 34(11):1500-7.

25. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**. 1998 ;52:453-90.

26. Lorena NS, Pitombo MB, Côrtes PB, et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: Resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. **Acta Cirurgica Brasileira**. 2010;25(5):455-9.

27. Pérez AO, Martín-de-Hijas N, Rodríguez NA, et al. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. 2011; 29(2):79-84.

28. Duarte RS, Lourenço MC, Fonseca LeS, et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Micobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**. 2009;47(7):2149-55.

29. Monego F, Duarte RS, Nakatani SM, et al. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 2011;15(5):436-41.

30. Souto AS, Duarte RS, Sabagh BP, et al. Tolerância de *Mycobacterium massiliense*, isoladas de surto do Rio de Janeiro, ao glutaraldeído a 2%. C. Ciências Biológicas. 2006. Microbiologia - 2. Microbiologia Aplicada.

31. Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, et al. Spectrum of diseases due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**. 1983;5:657–679.
32. Drabick JJ, Duffy PE, Samlaska CP, et al. Disseminated *Mycobacterium chelonae* subspecies *chelonae* infection with cutaneous and osseous manifestations. **Archives of Dermatology**. 1990;126:1064–1067.
33. Wallace RJ, Brown BA, Onyi GO. Skin, soft tissue, and bone infections due to *Mycobacterium chelonae*: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. **Clinical Infectious Diseases**. 1992;166:405–412.
34. Fonseca E, Alzate C, Canedo T, et al. Nodular lesions in disseminated *Mycobacterium fortuitum* infection. **Archives of Dermatology**. 1987;123:1603–1604.
35. Wright JE. Non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis. **Archives of Disease in Childhood**. 1986; 61(4): 368–371.
36. Pesce RR, Fejka S, Colodny SM. *Mycobacterium fortuitum* presenting as an asymptomatic enlarging pulmonary nodule. **American Journal of Medicine**. 1991;91:310–312.
37. Rolston KV, Jones PG, Fainstein V, et al. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria in patients with cancer. **Chest**. 1985;87:503–506.
38. Kesten S, Chaparro C. Mycobacterial infections in lung transplant recipients. **Chest**. 1999;115:741–745.
39. Gran JT, Eng J, Refvem OK. Monoarthritis due to *Mycobacterium chelonae*. **Journal of Rheumatology**. 1987;14:852–853.
40. Lowry PW, Jarvis WR, Oberle AD, et al. *Mycobacterium chelonae* causing otitis media in an ear-nose-and throat practice. **New England Journal of Medicine**. 1988;319:978–982.
41. Austin WK, Lockey MW. *Mycobacterium fortuitum* mastoiditis. **Archives of Otolaryngology**. 1976;102:558–560.

42. Choi WS, Kim MJ, Park DW, et al. Clarithromycin and amikacin vs. Clarithromycin and moxifloxacin for the treatment of post-accupunture cutaneous infections due to *Mycobacterium abscessus*: a prospective observational study. **Clinical Microbiology and Infection**. 2011;17:1084-1090.
43. Lorena NS, Duarte RS, Pitombo MB. Rapidly growing mycobacteria infection after videosurgical procedures: the glutaraldehyde hypothesis. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. 2009;36(3):266-7.
44. Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. 2012, 67:810-818.
45. Adekambi T, Berger P, Raoult D, et al. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2006; 56(Pt 1):133-43.
46. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M24-A2.Wayne, Pa. USA:CLSI;2011.
47. van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, et al. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous. **Drug Resistance Updates**. 2012;15:149-161.
48. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, et al. Non-mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. **PLoS One** 2009, 4:e5660.
49. Takiff HT, Cimino M, Musso MC, et al. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1996;93:362–366.
50. Prammananan T, Sander P, Brown BA, et al. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. **Journal of Infectious Diseases**. 1998,177: 1573–81.

51. Matrat S, Aubry A, Jarlier V, et al. Mutagenesis in the alpha3alpha4 GyrA helix and in the Toprim domain of GyrB refines the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2008; 52: 2909–14.
52. Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius, et al. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2009; 53: 3181–9.
53. Bastian S, Veziris N, Roux AL, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rrl* sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2011, 55: 775-781.
54. Kim H-Y, Kim BJB-J, Kook Y-HY, et al. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. **Microbiology and Immunology**. 2010;54: 347–53.
55. Ballarino GJ, Olivier KN, Claypool RJ, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: antibiotic treatment and associated costs. **Respiratory Medicine**. 2009, 103:1448–1455.
56. KyeongMan J, OJung K, NamYong L, et al. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2009, 180: 896-902.
57. Driscoll MS, Tying SK. Development of resistance to clarithromycin after treatment of cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 1997, 36: 495–496.
58. Tebas P, Sultan F, Wallace RJ, et al. Rapid development of resistance to clarithromycin following monotherapy for disseminated *Mycobacterium chelonae* infection in a heart transplant patient. **Clinical Infectious Diseases**. 1995, 20: 443–444.
59. Wallace RJ, Meier A, Brown BA, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 1996, 40:1676–1681.
60. Poehlsgaard J, Douthwaite S. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. **Current opinion in investigational drugs**. 2003; 4:140–8.

61. Bailey M, Chettiath T, Mankin AS. Induction of *erm* (C) expression by noninducing antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 2008, 52: 866-874.
62. Lai CJ, Weisblum B. Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1971, 68:856–860.
63. Buriankova K, Doucet-Populaire F, Dorson O, et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2004, 48:143–150.
64. Nash KA, Andini N, Zhang Y, et al. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2006, 50:3476–3478.
65. Luo L1, Li B, Chu H, et al. Characterization of *Mycobacterium Abscessus* Subtypes in Shanghai of China: Drug Sensitivity and Bacterial Epidemicity as well as Clinical Manifestations. **Medicine (Baltimore)**. 2016, 95:2338.
66. Chua KY, Bustamante A, Jelfs P, et al. Antibiotic susceptibility of diverse *Mycobacterium abscessus* complex strains in New South Wales, Australia. **Pathology**. 2015, 47:678-82.
67. Kim J, Sung H, Park JS, et al. Subspecies distribution and macrolide and fluoroquinolone resistance genetics of *Mycobacterium abscessus* in Korea. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. 2016, 20:109-14.
68. Tang SS, Lye DC, Jureen R, et al. Rapidly growing mycobacteria in Singapore, 2006-2011. **Clinical Microbiology and Infection**. 2015, 21:236-41.
69. Nunes L.DS, Baethgen LF, Ribeiro MO, et al. Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in southern Brazil: persistence of a single clone from 2007 to 2011. **Journal of medical microbiology**. 2014, 63: 1288-1293.
70. Meier A, Heifets L, Wallace RJ Jr, et al. Molecular mechanisms of clarithromycin in *Mycobacterium avium*: observation of multiple 23S rDNA mutations in a clonal population. **Journal of Infectious Diseases**. 1996, 174:354–360.

71-Nessar R, Reyrat JM, Murray A, et al. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2011, 66:1719-1724.

72. Rubio M, March F, Garriqó M, et al. Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the *Mycobacterium abscessus* Complex. **PloS one**. 2015, 10(10), e0140166.

73. Vester B, Douthwaite S. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA MINIREVIEW **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2001;45:1–12.

74. Lee S-H, Yoo HK, Kim SH, et al. Detection and Assessment of Clarithromycin Inducible Resistant Strains Among Korean *Mycobacterium abscessus* Clinical Strains: PCR Methods. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. 2014;6: 1–6.

75. Wallace RJ, Meier A, Brown BA, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 1996, 40:1676–1681.

76-Koh WJ, Jeon K, Lee NY, et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2010;183(3):405-10.

77-Choi GE, Shin SJ, Won CJ, et al. Macrolide Treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* infection and Inducible Resistance. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2012;186(9):917-925.

78. Esteban J, Martín-de-Hijas NZ, García-Almeida D, et al. Prevalence of *erm* methylase genes in clinical isolates of non pigmented, rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology and Infection**. 2009, 15:919-923.

79. Andini N, Nash KA. Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2006, 50:2560-2562.

80. Madsen CT, Jakobsen L, Buriankova K, et al. Methyltransferase *Erm(37)* slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**. 2005, 280:38942-38947.

81. Madsen CT, Jakobsen L, Douthwaite S. *Mycobacterium smegmatis* Erm(38) is a reluctant dimethyltransferase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2005, 49:3803-3809.
82. Nash KA. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel *erm* gene, *erm*(38). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2003, 47:3053-3060.
83. Nash KA., Zhang Y, Brown-Elliott BA, et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2005, 55:170-177.
84. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, et al. Erm(41)dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2014, 69: 1559-1563.
85. Gray TJ, Kong F, Jelfs P, et al. Improved Identification of Rapidly Growing Mycobacteria by a 16S-23S Internal Transcribed Spacer Region PCR and Capillary Gel Electrophoresis. **PLoS One**. 2014;9.
86. Cho Y-J, Yi H, Chun J, et al. The genome sequence of “*Mycobacterium massiliense*” strain CIP 108297 suggests the independent taxonomic status of the *Mycobacterium abscessus* complex at the subspecies level. **PLoS One**. 2013;8:e81560.
87. Douthwaite S, Fourmy D, Yoshizawa S. Nucleotide methylations in rRNA that confer resistance to ribosome-targeting antibiotics. **Topics in Current Genetics**. 2005, 12:287–309.
88. Schlunzen F, Zarivach R, Harms J, et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**. 2001, 413: 814–821.
89. Tu D, Blaha G, Moore PB, et al. Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. **Cell**. 2005, 121:257–270.
90. Brierley I. Macrolide-induced ribosomal frameshifting: a new route to antibiotic resistance. **Molecular cell**. 2013, 52: 613-615.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Principal

Avaliar o perfil de suscetibilidade e os mecanismos moleculares de resistência à claritromicina do complexo *Mycobacterium abscessus* encaminhados ao IPB-LACEN/RS nos anos de 2007 a 2012.

4.2 Objetivos Secundários

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima para claritromicina do complexo *M. abscessus*;
- Avaliar os mecanismos de resistência adquirida (gene *rrl*) e induzida (gene *erm(41)*) a claritromicina para o complexo *M. abscessus*;
- Correlacionar o perfil genotípico com o perfil fenotípico para resistência do complexo *M. abscessus*.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Can mutations in *rrl* and *erm(41)* be used as markers of clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus* complex?

Manuscrito enviado para publicação no *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

1 **Can mutations in *rrl* and *erm(41)* be used as markers of clarithromycin**
2 **resistance in *Mycobacterium abscessus* complex?**

3

4 Maiara S. Carneiro,^{a,c} Luciana S. Nunes,^{b,c} Simone M. De David,^d Afonso L.
5 Barth^{a,c}#

6

7 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Faculdade de
8 Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre,
9 Brazil^a; Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, Brazil^b;
10 Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de
11 Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre,
12 Brazil^c; Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Porto Alegre, Brazil^d.

13 Running Head: Clarithromycin resistance in *M. abscessus* complex

14 #Address correspondence to A. L. Barth, albarth@hcpa.edu.br

15 Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa em
16 Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, Porto
17 Alegre, Brazil, 2350 Ramiro Barcelos St, 90035-903. Porto Alegre, Brazil. Phone/fax:
18 +55 (51) 33598607.

19 Abstract

20 Infections due to *Mycobacterium abscessus* complex used to respond to
21 clarithromycin treatment but more recently treatment failure with this antibiotic has
22 been reported. It has been proposed the use of molecular markers to detect both
23 acquired (mutations in the *rrl* gene) and inducible (*erm(41)* polymorphism) resistance
24 in *M. abscessus* complex isolates. This study aimed to evaluate the profile of
25 susceptibility and the molecular markers of clarithromycin resistance in *M. abscessus*
26 complex. Susceptibility profile for clarithromycin was determined by broth
27 microdilution with reads at 3, 5, 7 and 14 days. Mutations in *rrl* and *erm(41)* genes
28 were evaluated by PCR with specific primers followed by sequencing. Clarithromycin
29 resistance, up to 3 days of incubation, was observed in 31 of 42 (73.8%) isolates.
30 Inducible clarithromycin resistance was observed in 6 of 11 (54.5%) isolates which
31 presented resistance only after 5 or 7 days of incubation. All isolates with inducible
32 resistance were *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Moreover, all 26 *M. abscessus*
33 subsp. *massiliense* had a deletion in *erm(41)*. Only 5 isolates proved to be
34 susceptible to clarithromycin after 14 days of incubation. None of the 42 isolates
35 presented a point mutation in the *rrl* gene and all isolates presented the T28
36 polymorphism of the *erm(41)* gene. The data of this study indicates a lack of
37 correlation of molecular markers of clarithromycin resistance for both acquired and
38 inducible resistance to clarithromycin.

39 Keywords: clarithromycin resistance, *erm(41)* gene, *rrl* gene, *M. abscessus* complex,
40 inducible resistance, acquired resistance.

41 Introduction

42 Several rapidly growing mycobacteria (RGM) are able to cause infections in
43 humans and most of these infections are caused by *M. abscessus* complex, *M.*
44 *chelonae* and *M. fortuitum* (1,2). *M. abscessus* complex is one of the most
45 pathogenic and multidrug-resistant (MDR) RGM. Infections due to *M. abscessus*
46 complex are difficult to treat (3,4) because this group of mycobacteria are intrinsically
47 resistant not only to classic antituberculosis drugs, but also to the majority of
48 antibiotics that are currently available (2).

49 Bacterial resistance mechanisms have already been characterized for a broad
50 range of bacteria (5), however, clarithromycin inducible resistance mechanisms in *M.*
51 *abscessus* complex was described less than ten years ago. It was believed that
52 clarithromycin resistance was caused by the permeability problems involving the
53 special nature of the mycobacterial cell wall, besides antibiotic inactivation, active
54 drug efflux, and mutated ribosome components (ribosomal proteins or 23S rRNA) (6).
55 Nowadays, it is believed that inducible resistance is mainly related to a T/C
56 polymorphism at the 28th nucleotide in *erm(41)* gene (7, 8, 9). In fact, clarithromycin
57 has become the drug of choice of infections caused by the *M. abscessus* complex
58 (2), being the mainstay for treatment and this lasted until the induced resistance, due
59 to *erm(41)*, was described (10, 8). As resistance to clarithromycin is increasing, its
60 use as monotherapy for treatment is not recommended; clarithromycin should be
61 combined with other drugs (11, 12, 13).

62 Acquired resistance to clarithromycin is related to point mutations in a region of
63 the *rrl* gene encoding to the peptidyltransferase domain of the 23S rRNA (8). It has
64 been described that the main molecular mechanism of clarithromycin acquired
65 resistance occurs through point mutations at either the adenine at position 2058
66 (A2058G) or at position A2059 in 23S rRNA gene (14).

67 Considering the phenotypic tests (profile of susceptible), acquired resistance
68 can be detected up to 5 days of incubation of the *M. abscessus* complex with
69 clarithromycin while inducible resistance requires at least 5 days of incubation (9).

70 The aim of this study was to evaluate the correlation of the profile of
71 susceptibility and the molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *M.*
72 *abscessus* complex.

73

74 Materials and Methods

75 A total of 42 isolates (14 *M. abscessus* subsp. *abscessus*; 28 *M. abscessus*
76 subsp. *massiliense*) from a previous surveillance study performed between 2007 and
77 2013 were used in this study. The susceptibility profile was determined by broth
78 microdilution following the guidelines established by the Clinical and Laboratory
79 Standards Institute - CLSI document M24-A2 (15), with readings at days 3, 5, 7 and
80 14. Point mutations in *rrl* and *erm*(41) genes were evaluated by PCR amplification
81 with primers 18 (AGT CGG GAC CTA AGG CGA G) and 21 (TTC CCG CTT AGA
82 TGC TTT CAG), steps: 94°C for 7 min followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 51°C
83 for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 10 minutes at 72°C according to Méier et al.
84 (16) ERM1f (CGC CAA CGA CGA GCA GCT CG) (9) and MC823 (GAC TTC CCC
85 GCA CCG ATT CCA C) (8), respectively. The PCR protocol included the following
86 steps: 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 64°C for 1 min and
87 72°C for 1 min, followed by 10 minutes at 72°C. The PCR reactions generated
88 fragments of 1500 bp for *rrl* gene and 724 bp for *erm* gene. *M. abscessus* ATCC
89 19977 was used as quality control.

90 The genetic profiles of the two genes were performed by partial sequencing
91 using ABI 3500 Genetic Analyzer with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied
92 Biosystems). PCR products were labeled with 3.2 pmol of specific primers and 1 µL
93 of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final
94 volume of 10 µL. Alignment of the sequences was performed in the program
95 Biological Sequence Alignment Editor – BioEdit 7.2-5. The homology analysis was
96 performed by comparison of the consensus sequence obtained from each isolate with
97 those deposited in the GenBank using the BLAST algorithm (Basic Local Alignment
98 Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The ATCC 19977 strain was
99 included as reference for sequence alignment. This study was approved by the Ethics

100 Committee of “Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)” of “Hospital de
101 Clínicas de Porto Alegre” (reference number CAAE: 35684114.5.0000.5327).

102

103 Results

104 Susceptibility profile for clarithromycin was distinguished in three patterns,
105 Pattern 1: clarithromycin resistance, up to 3 days of incubation, which was observed
106 in 31 of 42 (73.8%) isolates (13 *M. abscessus* subsp. *abscessus*; 18 *M. abscessus*
107 subsp. *massiliense*); Pattern 2: clarithromycin resistance after 5 days, which was
108 observed in 6 of 11 (54.5%) isolates (all these isolates were *M. abscessus* subsp.
109 *massiliense*); Pattern 3: clarithromycin susceptibility up to the 14th day, which was
110 observed in 5 of 11 (45.5%) isolates (1 *M. abscessus* subsp. *abscessus*; 4 *M.*
111 *abscessus* subsp. *massiliense*) - Table 1.

112 None of the 42 isolates presented a point mutation at the positions 2058 or
113 2059 in the peptidyltransferase region of the 23S rRNA (*rrl*) - the gene related with
114 acquired resistance to clarithromycin. For all isolates, PCR generated an amplicon
115 showing the presence of the *erm(41)* gene at the expected size (724 bp) for *M.*
116 *abscessus* subsp. *abscessus* and at a size of approximately 500 bp for *M.*
117 *abscessus* subsp. *massiliense*. All these isolates also presented the T/C
118 polymorphism at the 28th nucleotide belonging to the 10th codon. Moreover, all *M.*
119 *abscessus* subsp. *massiliense* had deletion in *erm(41)* observed in comparison to the
120 reference sequence (ATCC 19977) – Table 1.

121 Noteworthy, it was possible to identify point mutations in other positions of *rrl*
122 and *erm(41)* genes but these did not lead to amino acid alteration (silent mutations) –
123 Table 2.

124

125 Discussion

126 The widespread use of macrolides in clinical medical care has created favorable
127 conditions for the selection of resistant isolates of RGM (17). The two main
128 mechanisms of macrolide resistance are drug-efflux pumps and modification of the

129 drug target site in the ribosome, through expression of *erm* methylase (18, 19). This
130 *erm* prevent binding of the antibiotic to the ribosome by mono or dimethylation which
131 disturbs the shape and chemical makeup of the drug-binding site, thereby reducing
132 the affinity of the macrolide to the ribosome (20, 21, 22). The expression of *erm* is
133 highly regulated, being induced in the presence of macrolides, however its
134 expression is not favorable for the cell because it is associated to significant fitness
135 costs (23).

136 Nash et al., (8) and Kim et al., (24) investigated several isolates of the *M.*
137 *abscessus* complex and found that *M. abscessus* subsp. *massiliense* were
138 susceptible to clarithromycin, while the susceptibility profile of *M. abscessus* subsp.
139 *abscessus* was variable. Conversely, we found a high percentage (24/28 - 85.7%) of
140 *M. abscessus* subsp. *massiliense* which presented (acquired or induced) resistance
141 to clarithromycin. This difference of susceptibility profile may be related to local or
142 regional characteristics of RGM isolates. It has to be considered that most isolates of
143 our study belonged to the same clone which, albeit, were originated from several
144 outbreaks in different cities in southern Brazil (25).

145 Considering the molecular profile of RGM isolates, Nash et al., (8) and Kim et
146 al. (24), found polymorphisms at position 28 of *erm*(41) being a T28 related to
147 resistance and C28 related to susceptibility. Therefore, the polymorphism T28 in *M.*
148 *abscessus* subsp. *abscessus* could be considered a clarithromycin resistance
149 marker. In our study, all 14 isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus* presented a
150 T28 and only one was susceptible to clarithromycin. It has to be considered that in
151 the study of Kim et al, no prolonged incubation was evaluated (reads were made at
152 5th day of incubation).

153 Considering *M. abscessus* subsp. *massiliense*, the T28 polymorphism is not
154 necessarily related to clarithromycin inducible resistance as the position 28 is located
155 upstream the deletion which leads to resistance. However, several cases of *M.*
156 *abscessus* subsp. *massiliense* with the functional *erm*(41) gene have been reported
157 (26). Moreover, two isolates of *M. abscessus* subsp. *massiliense* with a functional
158 *erm*(41) gene showing inducible clarithromycin resistance after 14 days haven
159 described (27). We found 6/28 (21.4%) isolates with inducible resistance which
160 indicates that the gene is functional regardless the presence of deletion.

161 Regarding the molecular basis of acquired resistance, *rrl* gene sequencing
162 showed absence of mutations (wild-type) at positions 2058 and 2059 of the 23S
163 rRNA in all isolates of this study. However, we found 31/42 (73.8%) isolates which
164 presented resistance up to 3 days of incubation which indicates that there may be
165 another molecular mechanism involved in acquired resistance. Although isolates wild-
166 type for the *rrl* gene resistant to clarithromycin are not an usual finding, Maurer et al.
167 described the presence of resistant isolates without mutation in the *rrl* gene in *M.*
168 *abscessus* subsp. *abscessus* (14). Therefore, mutations at 23S rRNA solely cannot
169 be used as a marker for acquired resistance to clarithromycin.

170 Our study observed the presence of *erm(41)* gene in susceptible strains which
171 did not developed resistance up to 14 days of incubation. Esteban et. al., (28)
172 demonstrated low MIC for isolates *erm(41)* positive and isolates *erm(41)* negative
173 with high MICs. Therefore the presence of *erm(41)* gene is not necessarily correlated
174 with resistance of higher MIC of clarithromycin.

175 The main finding of our study was the high number of *M. abscessus* complex
176 isolates (73.8%) with resistance to clarithromycin which did not correlate with *rrl*
177 mutation. We also found that 5 isolates did not developed phenotypic resistance *in*
178 *vitro* regardless the presence of the T28 *erm(41)* gene. Therefore, one should
179 consider that the results of *erm(41)* and *rrl* sequencing are not fully concordant with
180 phenotypic clarithromycin susceptibility tests.

181

182 Acknowledgements

183 This study received financial support from the “Conselho Nacional de
184 Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq” - Brazil (168206/2014-5) and,
185 FIFE/HCPA (14-0668). The authors would like to thank the staff from the “Seção de
186 Micobactérias do IPB/LACEN-FEPPS, Laboratório de Micobactérias” for processing
187 the samples and culture management.

188 REFERENCES

- 189 1. Brown-Elliott, B. A., D. E. Griffith, and R. J. Wallace, Jr. 2002. Newly described or
190 emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect. Dis. Clin. N.*
191 *Am.* **16**: 187–220.
- 192 2. Brown-Elliott, B. A., and R. J. Wallace, Jr. 2002. Clinical and taxonomic status of
193 pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin.*
194 *Microbiol. Rev.* **15**: 716–746.
- 195 3. Ballarino, G. J., K. N. Olivier, R. J. Claypool, S. M. Holland, and D. R. Prevots.
196 2009. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: antibiotic treatment
197 and associated costs. *Respir. Med.* **103**:1448–1455.
- 198 4. KyeongMan, J., OJung, K., NamYong, L., BumJoon, K., YoonHoh, K.,
199 SeungHeon, Kil Park, Y., Ki Kim, C., Koh, W. 2009. Antibiotic treatment of
200 *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients.
201 *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **180**: 896-902
- 202 5. Buriankova, K., Doucet-Populaire, F., Dorson, O., Gondran, A., Ghnassia, J. C.,
203 Weiser, J., Pernodet, J. L. 2004. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance
204 in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrobial Agents and*
205 *Chemotherapy.* **48**:143–150.
- 206 6. Nash, K. A., Andini, N., Zhang, Y., Brown-Elliott, B. A., Wallace, R. J. 2006.
207 Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. *Antimicrobial*
208 *Agents and Chemotherapy.* **50**:3476–3478.
- 209 7. Maurer, F. P., Castelberg, C., Quiblier, C., Böttger, E. C., Somoskövi, A. 2014.
210 *Erm(41)*dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in
211 clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. *The Journal of Antimicrobial*
212 *Chemotherapy* **69**: 1559-1563.
- 213 8. Nash, K. A., B. A. Brown-Elliott, and R. J. Wallace, Jr. 2009. A novel gene,
214 *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of
215 *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*.
216 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **53**:1367–1376.
- 217 9. Bastian, S., Veziris, N., Roux, A. L., Brossier, F., Gaillard, J. L., Jarlier, V.,
218 Cambau, E. 2011. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging
219 to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm(41)* and *rrl* sequencing.
220 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **55**: 775-781.
- 221 10. Griffith, D. E., et al. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment,
222 and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit.*
223 *Care Med.* **175**:367–416.
- 224 11. Driscoll, M. S., Tying, S. K. 1997. Development of resistance to clarithromycin
225 after treatment of cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection. *J Am Acad*
226 *Dermatol.* **36**: 495–496.
- 227 12. Tebas, P., Sultan., Wallace, R. J., Fraser, V. 1995. Rapid development of
228 resistance to clarithromycin following monotherapy for disseminated

- 229 *Mycobacterium chelonae* infection in a heart transplant patient. Clin Clinical
230 Infectious Diseases. **20**: 443–444.
- 231 13. Wallace, R. J., Meier, A., Brown, B. A., Zhang, Y., Sander, P., Onyi, G. O.,
232 Böttger, E. C. 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of
233 *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrobial Agents
234 and Chemotherapy. **40**:1676–1681.
- 235 14. Maurer, F. P., Rügger, V., Ritter, C., Bloemberg, G. V., Böttger, E.C. 2012.
236 Acquisition of clarithromycin resistance mutations in the 23S rRNA gene of
237 *Mycobacterium abscessus* in the presence of inducible *erm*(41). The Journal of
238 antimicrobial chemotherapy **67**: 2606–2611.
- 239 15. CLSI. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic*
240 *Actinomycetes; Approved Standard—Second Edition*. CLSI document M24-A2.
241 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- 242 16. Meier, A., Kirschner, P., Springer, B., Steingrube, V., Brown, B., Wallace, R.,
243 Böttger, E. 1994. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin
244 resistant *Mycobacterium intracellulare*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
245 **38**: 381-384.
- 246 17. Bailey, M., Chettiath, T., Mankin, A. S. 2008. Induction of *erm* (C) expression by
247 noninducing antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy **52**: 866-874.
- 248 18. Lai, C. J., and B. Weisblum. 1971. Altered methylation of ribosomal RNA in an
249 erythromycinresistant strain of *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci.
250 **68**:856–860.
- 251 19. Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J. M., Murray, A., & Gicquel, B. 2012.
252 *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. Journal of antimicrobial
253 chemotherapy. **67**:810-818.
- 254 20. Douthwaite, S., D. Fourmy, and S. Yoshizawa. 2005. Nucleotide methylations in
255 rRNA that confer resistance to ribosome-targeting antibiotics. Top. Curr. Genet.
256 **12**:287–309.
- 257 21. Schlunzen, F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath,
258 and F. Franceschi. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the
259 peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature **413**: 814–821.
- 260 22. Tu, D., G. Blaha, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2005. Structures of MLSBK
261 antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural
262 explanation for resistance. Cell **121**:257– 270.
- 263 23. Brierley, Ian. 2013. Macrolide-induced ribosomal frameshifting: a new route to
264 antibiotic resistance. Molecular cell. **52**: 613-615.
- 265 24. Kim, H. Y., Kim, B. J., Kook, Y., Yun, Y. J., Shin, J. H., Kim, B. J., Kook, Y. H.
266 2010. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium*
267 *abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome
268 methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. Microbiol.
269 Immunol. **54**: 347–353.
- 270 25. Nunes, L. D. S., Baethgen, L. F., Ribeiro, M. O., Cardoso, C. M., de Paris, F., De
271 David, S. M., Silva, M. G., Duarte, R. S., Barth, A. L. 2014. Outbreaks due to

- 272 *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in southern Brazil: persistence of a
273 single clone from 2007 to 2011. Journal of medical microbiology, **63**: 1288-1293.
- 274 26. Gray, T. J., Kong, F., Jelfs, P., Sintchenko, V., Chen, S. C. 2014. Improved
275 Identification of Rapidly Growing Mycobacteria by a 16S-23S Internal Transcribed
276 Spacer Region PCR and Capillary Gel Electrophoresis. PLoS One, **9**:102290.
- 277 27. Shallom, S. J., Gardina, P. J., Myers, T. G., Sebastian, Y., Conville, P., Calhoun,
278 L. B., Tettelinc, H., Olivierd, K., Uzeld, G., Sampaio, E., Hollandd, S., Zelaznya,
279 A.. 2013. New rapid scheme for distinguishing the subspecies of the
280 *Mycobacterium abscessus* group and identifying *Mycobacterium massiliense*
281 isolates with inducible clarithromycin resistance. Journal of clinical microbiology.
282 **51**:2943-2949.
- 283 28. Esteban, J., Martín-de-Hijas, N. Z., García-Almeida, D., Bodas-Sánchez, A.,
284 Gadea, I., Fernández-Roblas, R. 2009. Prevalence of *erm* methylase genes in
285 clinical isolates of nonpigmented, rapidly growing mycobacteria. Clinical
286 Microbiology and Infection **15**:919-923.

287 Table 1. Clarithromycin MICs and sequencing results of *erm(41)* and *rrl* genes
288

Species	Pattern	N isolates	MIC* µg/mL				<i>rrl</i> **	<i>erm(41)</i> **
			day 3	day 5	day 7	day 14		
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	1	8	8	8	8	8	WT***	T28
		1	8	16	16	16	WT	T28
		4	16	16	16	16	WT	T28
		3	32	32	32	32	WT	T28
		1	32	32	32	64	WT	T28
		1	64	64	64	64	WT	T28
	2	1	0,125	1,125	8	8	WT	T28
		1	0,25	0,25	8	8	WT	T28
		1	1	1	16	16	WT	T28
		1	1	32	32	32	WT	T28
		2	2	32	32	32	WT	T28
		3	1	0,25	0,25	0,25	0,25	WT
	3	2	0,25	0,25	0,5	0,5	WT	T28
		1	0,25	0,25	0,5	1	WT	T28
		2	8	8	8	8	WT	T28
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	1	1	8	16	16	16	WT	T28
		3	16	16	16	16	WT	T28
		1	16	32	32	32	WT	T28
		3	32	32	32	32	WT	T28
		3	32	32	64	64	WT	T28
	3	1	0,6	0,125	0,125	0,125	WT	T28

289 *Minimum Inhibitory Concentration; **Comparison to *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977; ***Wild-type.

290

291 Table 2: Positions of nucleotide substitutions in *rrl* and *erm(41)* genes

	Isolate	Position	Point mutation	Susceptible profile	Species
<i>rrl</i>	121321	2138	G - C	Pattern 1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> *
	131205	1522	C - T	Pattern 1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> *
		1743	A - T		
	131253	1746	A - G	Pattern 1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> *
		1713	C - T		
	900769	1320	A - C	Pattern 2	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> *
		1335	T - G		
		1377	C - G		
	110636	1371	G - A	Pattern 2	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> *
		1294	A - T		
	900161	1296	T - C	Pattern 1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> *
1335		T - C			
<i>erm(41)</i>	131253	120	A - G	Pattern 1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> **
	121187				
	110920	159	T - C	Pattern 1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> **
	900769	238	A - G	Pattern 2	
	131253	255	C - A	Pattern 1	
	130295	330	A - C	Pattern 1	
	121187			Pattern 1	
	900161			Pattern 1	
	130295	275	G - T	Pattern 1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> **
	121187	336	T - C		
	900161				
800107	67	C - T	Pattern 2	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> ***	
	184	C - A			
	204	A - G			
	218	C - T			

292 *The gene sequence of *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 was used as reference; **The gene sequence of

293 *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 was used as reference; ***The gene sequence of *Mycobacterium*

294 *massiliense* strain RGM140 FJ358490.1 was used as reference.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A principal conclusão obtida através do nosso estudo foi que os dados moleculares do perfil genotípico de *erm(41)* e *rrl* não são totalmente concordantes com os testes fenotípicos de sensibilidade a claritromicina, visto que, em nosso estudo tivemos um elevado número de isolados do complexo *M. abscessus* com resistência a claritromicina que não apresentou correlação com a mutação no gene *rrl*. Além disso, 5 isolados não desenvolveram resistência fenotípica *in vitro*, mesmo na presença do gene *erm(41)* com polimorfismo no nucleotídeo T28.

Alto índice de resistência adquirida à claritromicina (antes de 3 dias) entre isolados do complexo *M. abscessus*.

Alto índice de resistência adquirida à claritromicina entre isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, sendo que a literatura indica que essa subespécie deveria ser sensível a claritromicina.

Todos os isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* apresentaram deleção de aproximadamente 200pb no gene *erm(41)*mas, apesar disso, 6 isolados (21,4% 6/28) foram capazes de desenvolver resistência a claritromicina.

Um isolado de *M. abscessus* subsp. *abscessus* não desenvolveu resistência adquirida mesmo na presença do polimorfismo no nucleotídeo T28 do gene *erm(41)*, o que ainda não havia sido descrito na literatura.

Várias mutações pontuais foram observadas em outras posições nos genes *rrl* e *erm(41)*, mas as mesmas não acarretaram em troca de aminoácido.

Os isolados do complexo *M. abscessus* têm grande possibilidade de apresentarem outro mecanismo molecular envolvido na resistência adquirida a claritromicina.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL MOLECULAR E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A CLARITROMICINA DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35684114.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 880.730

Data da Relatoria: 18/11/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto “PERFIL MOLECULAR E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A CLARITROMICINA DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO” é um estudo transversal retrospectivo, de coparticipantes, que pretende avaliar o perfil molecular e de susceptibilidade das MCR (Micobactérias de Crescimento Rápido) à claritromicina encaminhados ao Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central do Estado, IPB-LACEN/RS nos anos de 2007 à 2012. Esta avaliação será realizada através da determinação da CIM (concentração inibitória mínima) à claritromicina e aos principais agentes antimicrobianos, e da determinação dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência das MCR através da realização de sequenciamento do gene *erm* nas amostras resistentes à claritromicina. Posteriormente será realizada a correlação entre os dados clínicos do paciente com o perfil de resistência à droga, para que se possa ter uma maior compreensão dos mecanismos de resistência relacionados às MCR.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar o perfil de susceptibilidade e os mecanismos moleculares de resistência à claritromicina das MCR encaminhados ao IPB-LACEN/RS nos anos de 2007 à 2012.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)359--7640 **Fax:** (513)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 880.730

Objetivos específicos

- Determinar a CIM das MCR à claritromicina e aos principais agentes antimicrobianos;
- Correlacionar os dados clínicos do paciente com o perfil de resistência;
- Avaliar os mecanismos moleculares de resistência à claritromicina para MCR;
- Realizar o sequenciamento do gene erm nas amostras resistentes à claritromicina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Possíveis Riscos:

Não apresenta riscos.

Deve ser considerado o risco de quebra de confidencialidade, minimizado pelo preenchimento de Termo de Compromisso preenchido pelos pesquisadores.

Possíveis Benefícios:

O trabalho vem auxiliar na evidenciação do perfil molecular e de susceptibilidade das MCR, através da determinação da CIM à claritromicina e aos principais agentes antimicrobianos, assim como, a avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência das MCR, através da realização de sequenciamento do gene erm nas amostras resistentes à claritromicina. E, posterior correlação entre os dados clínicos do paciente com o perfil de resistência a droga, para que se possa ter uma maior compreensão dos mecanismos de resistência relacionados às MCR. Não há benefício direto para os participantes, está previsto benefício coletivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O crescente número de publicações científicas abordando infecções causadas por MCR (Mycobacterias de Crescimento Rápido) sugere que estes microrganismos podem ser considerados patógenos emergentes, sendo responsáveis por surtos de doença em todo o mundo. A frequência progressiva do aparecimento de MCR, na rotina laboratorial e clínica, demonstram a importância que tais patologias vêm assumindo, no decorrer dos anos, em nossa comunidade, demonstrando assim a importância de investigação das cepas de MCR presentes em nosso Estado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto inclui contextualização do tema, justificativa, hipótese, objetivos, metodologia, aspectos éticos, cronograma de atividades e referências bibliográficas. Também foi incluído Formulário de Delegação de Funções, Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico, Termo de Compromisso de Divulgação, Termo de Compromisso para Utilização do Banco de Dados e Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359--7640 **Fax:** (51)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 880.730

Não foi incluído o aceite da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

É necessário esclareces as seguintes pendências relacionadas abaixo:

1) Esclarecer o envolvimento do Hospital de Clínicas no estudo e onde serão realizadas as etapas do projeto. Não fica claro no projeto qual o envolvimento do HCPA no estudo, com exceção do vínculo do pesquisador principal; não é mencionado se este será o local de realização dos experimentos ou de outra atividade.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Os experimentos serão realizados no Hospital de Clínicas, no Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS).” Esclarecimento incluso no item: “Metodologia Proposta.

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

2) O projeto está vinculado ao PPG em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, e as amostras a serem utilizadas serão oriundas do Instituto de Pesquisas Biológicas, Laboratório Central do Estado, IPBLACEN/RS, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). No entanto, não é apresentada uma carta de concordância ou de aprovação por parte do Grupo de Política de Pesquisa desta instituição.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Foi incluso o anexo intitulado “Termo de Autorização de Atividades”, onde consta a assinatura da chefe da Seção de Micobactérias (Simone Minghelli), a assinatura da chefe da Divisão de Biologia Médica (Maria de Fátima Tostes de Abreu) e do diretor do IPB-Lacen/RS (Fernando Kappke).

PENDÊNCIA ATENDIDA.

3)Esclarecer o tamanho da amostra e cálculo do tamanho amostral. Não é apresentado no projeto o cálculo do tamanho amostral, apenas é mencionado que serão avaliados 43 isolados de MCR no projeto, mas no formulário da Plataforma Brasil consta o número de 65 isolados de MCR. Qual é o número correto? Como os pesquisadores chegaram neste número?

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Serão incluídos no estudo 65 cepas de Micobactérias de Crescimento Rápido, que compõe todas as cepas de MCR do banco de culturas do IPB-Lacen/RS, entre os anos de 2007 a 2012, não foi realizado cálculo amostral, pois trata-se de um estudo com

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)359-7640 **Fax:** (513)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 880.730

amostragem por conveniência.

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

4) Não foi incluído no projeto o item 'descrição das análises estatísticas', e no formulário da Plataforma Brasil foi mencionado de forma muito sucinta. Incluir descrição de como os diferentes tipos de dados serão analisados, bem como quais os tipos de testes que poderão ser utilizados.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Foi incluído no projeto o item "Análises Estatísticas". O item "Metodologia de Análise de dados", foi complementado com os seguintes dados: Serão realizadas análises estatísticas para variáveis contínuas, sendo utilizada a estatística descritiva. Para variáveis dicotômicas ou policotômicas será utilizada a estatística não paramétrica. O teste Exato de Fischer e teste t de Student serão utilizados para a análise comparativa dos grupos ($P < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo).

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

5) Não foi incluído no projeto o item 'critérios de inclusão e exclusão", embora no item 3.2 - Amostras e Isolados fique subtendido quais são esses critérios. Sugerimos indicar mais claramente no texto quais seriam esses critérios.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Foram incluídos no estudo apenas cepas de Micobactérias de Crescimento Rápido, as quais foram provenientes do IPB-Lacen/RS. Em casos de pacientes com mais de uma amostra por ano, será selecionada apenas uma cepa referente a cada ano do estudo.

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

6) Rever a avaliação risco/benefício de acordo com o descrito no campo Avaliação dos Riscos e Benefícios.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Deve ser considerado o risco de quebra de confidencialidade, minimizado pelo preenchimento de Termo de Compromisso preenchido pelos pesquisadores.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)359--7640 **Fax:** (513)359--7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 880.730

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão do projeto de 29/10/2014 e demais documentos submetidos até a presente data, que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deverá estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras. O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. A comunicação de eventos adversos ocorridos no estudo deverá ser realizada através do Sistema GEO – Gestão Estratégica Operacional, disponível na intranet do HCPA.

PORTO ALEGRE, 21 de Novembro de 2014

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

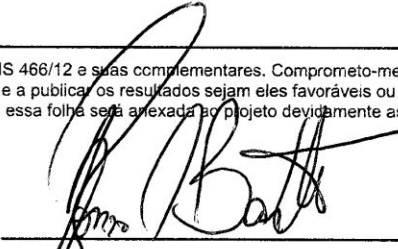
Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)359-7640 **Fax:** (513)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

7.2 ANEXO II - Folha de Rosto Plataforma Brasil



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: PERFIL MOLECULAR E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A CLARITROMICINA DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO		2. Número de Participantes da Pesquisa: 65	
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Afonso Luis Barth			
6. CPF: 415.701.540-15		7. Endereço (Rua, n.º): TULIO DE ROSE PASSO D'AREIA 400/802B PORTO ALEGRE RIO GRANDE DO SUL 91340110	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (51) 9807-5512	10. Outro Telefone:
		11. Email: albarth@hcpa.ufrgs.br	
12. Cargo:			
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: 01 / 08 / 2014		 Assinatura HCPA Afonso Luis Barth <small>Barman de An. Biológico - CRF-RS 3483</small>	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Hospital de Clínicas de Porto Alegre		14. CNPJ: 87.020.517/0001-20	15. Unidade/Orgão:
16. Telefone: (51) 3359-7640		17. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: _____		CPF: _____	
Cargo/Função: _____			
Data: ____ / ____ / ____		_____	
		Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
18. Nome: 5326 Hospital de Clínicas de Porto Alegre		19. Telefone: (51) 3359-7640	20. Outro Telefone:
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.</p>			
Nome: _____		CPF: _____	
Cargo/Função: _____		Email: _____	
Data: ____ / ____ / ____		_____	
		Assinatura	