

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE  
DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO NO RIO GRANDE DO SUL**

Luciana de Souza Nunes

Porto Alegre, março de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE  
MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO NO RIO GRANDE DO SUL

Luciana de Souza Nunes

Orientador: Afonso Luís Barth

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como  
requisito para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, março de 2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Luciana de Souza  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA  
SUSCETIBILIDADE DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO  
RÁPIDO NO RIO GRANDE DO SUL / Luciana de Souza  
Nunes. -- 2014.  
99 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Micobactérias de crescimento rápido. 2. Surtos  
por procedimentos invasivos. 3. Resistência a  
quinolonas. I. Barth, Afonso Luis, orient. II. Título.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado em três instituições distintas: 1) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) - Centro de Pesquisa Experimental; 2) Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS) na Seção de Micobactérias e 3) Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no Laboratório de Micobactérias.

O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (09-0653), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq; Edital Universal, processo n°. 480789/2010-0 MCT/CNPq 14/2010), ICOHRTA 5 U2R TW006883-02 e ENSP-011-LIV-10-2-3 e também recebeu apoio financeiro na forma de bolsa de estudo patrocinada pelo CNPq.

*Dedico este trabalho aos meus amados pais Miguel de Souza Nunes e  
Sirce Lorenita Chielle Nunes, pelo amor incondicional, e ao meu amor  
Rafael Marques Borges pela dedicação e incentivo, pois graças a eles eu  
consegui realizar este sonho.*

## **Agradecimentos**

Primeiro de tudo eu gostaria de agradecer ao meu orientador Afonso Luís Barth pela oportunidade de realizar esses estudos e acreditar na minha capacidade, por todo o auxílio, incentivo, ensinamentos e dedicação na orientação deste trabalho.

Agradecimentos especiais ao Prof. Rafael Silva Duarte por me receber em seu laboratório na UFRJ onde a maior parte da pesquisa de bancada foi realizada e ao Marlei Gomes da Silva que me ensinou todos os detalhes de desenvolvimento das técnicas.

Também a equipe da Seção de Micobactérias Marta Ribeiro Osório, Simone Minguelli, Simone Maria Martini De David, Joceli Carollo e Ludmila Fiorenzano Baethgen por me receberem tão bem, acreditarem na pesquisa e me ajudarem tanto com o material necessário como também com muito incentivo e carinho.

Gostaria também de agradecer a todas as pessoas de todos os laboratórios por onde passei nesse doutorado, que não foram poucos!!!

Agradeço as colegas do LABRESIS e em especial a Franciele e Mariana e mais que especial a Vanessa Bley Ribeiro, que me ajudou muito com a elaboração deste trabalho, principalmente na organização do futuro e da vida.

A todos amigos que fizeram parte deste trabalho de uma forma ou outra, na banca, em congressos, em happy hour, caminhadas, corridas... Raquel, Cássia, Patrícia, Fernanda De Paris, Fernanda Spies e Aline Teichmamm.

As alunas de IC que fizeram parte deste estudo Maiara Carneiro e Roberta Flôres Silva, muito obrigada pela dedicação prestada a este trabalho.

As minhas colegas de pesquisa e do início de uma caminhada docente, Lia Possuelo e Andréia Valim.

Agradeço também ao CNPq pelo apoio financeiro a minha pesquisa com o edital universal, a bolsa de doutorado e taxa de bancada.

E para finalizar a minha família, que sempre, sempre, sempre me entendeu, apoiou, incentivou, torceu e orgulhou-se muito de mim, obrigada pai e mãe! Aos meus irmãos e sobrinhos que sempre entenderam minha ausência em momentos importantes.

E gostaria de fazer um agradecimento mais do que especial ao meu querido e muito amado namorado Rafael pelo amor incondicional, por todo o apoio e incentivo, mesmo quando eu mesma nem me apoiaria e me incentivaria! MUITO OBRIGADA!

"I have fought the good fight, I have finished  
the race, I have kept the faith"

(2Ti, 4:7)



## Resumo

Surtos associados às micobactérias de crescimento rápido (MCR) têm sido cada vez mais relatados em todo o mundo, inclusive no Brasil. Entre as MCR, o complexo *M. abscessus* é o mais patogênico e relacionado a multirresistência. Considerando a importância de investigar as cepas de MCR presentes em nosso Estado, este estudo teve como objetivos avaliar o perfil molecular e de suscetibilidade caracterizando os isolados de MCR encaminhados para o Centro de Referência em Micobactérias do Estado (Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública, IPB-LACEN/RS). Além disso, foram avaliados os mecanismos de resistência à FQ conferido pelos genes *gyrA* e *gyrB*. Foram encaminhadas para o IPB-LACEN/RS, entre 2007 a 2012, 74 isolados clínicos. No total, 43 isolados relacionados a surto e 31 isolados de MCR não relacionados a surtos foram analisados. Pela técnica de PRA-*hsp65* foi possível identificar 43 isolados como *M. abscessus* tipo 2, 21 isolados como *M. fortuitum* tipo 1 e 10 isolados como *M. abscessus* tipo 1. Através do sequenciamento parcial do gene *rpoB*, foi confirmada a identificação de *M. abscessus* tipo 2 como *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* tipo 1 como *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. fortuitum* tipo 1 como *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*. Pela técnica de tipagem PFGE todos os isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii* apresentaram o mesmo perfil clonal o qual pertence ao clone BRA100, já descrito mundialmente. Os isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* apresentaram perfis distintos de PFGE. O perfil de suscetibilidade aos antibióticos foi avaliado por microdiluição em caldo de acordo com CLSI (2011) e, todos os isolados foram sensíveis a amicacina e todos foram resistentes a doxiciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. Para *M. abscessus* subsp. *bolletii* todos os isolados foram resistentes à ciprofloxacino, moxifloxacino e tobramicina e um padrão de susceptibilidade variável foi observado para cefoxitina (Sensível - 28%, Intermediário - 72%) e claritromicina

(Sensível - 86%, Resistentes - 14%). Cabe mencionar que este é o primeiro relato de resistência a claritromicina para o clone BRA100. Para *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* todos os isolados foram resistentes a claritromicina; já para a cefoxitina e tobramicina um padrão de susceptibilidade variável foi observado. Todos os isolados de *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* foram sensíveis à ciprofloxacino, em contraste aos isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* que apresentaram 70% de resistência. Todas MCR, resistentes (ou intermediárias) para ciprofloxacino apresentaram uma Ala-83 em GyrA, em contraste com uma Ser-83 em todos os isolados de *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* sensíveis a ciprofloxacino, mas com perfil de resistência variável a moxifloxacino. Nenhuma diferença foi encontrada em GyrB independentemente do perfil de sensibilidade de MCR. Em conclusão, nosso estudo relata a persistência de um único clone *M. abscessus* subsp. *bolletii* BRA100 relacionado aos surtos, altamente resistente, mesmo após a implementação nacional das medidas de controle de infecção para contenção de surtos por MNTs. Também foi possível correlacionar que mutações no aminoácido Ala-83 de GyrA estão diretamente relacionados com a resistência à ciprofloxacino em *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

Palavras-chave: Micobactérias de crescimento rápido; surtos por procedimentos invasivos; resistência a quinolonas.

## Abstract

Outbreaks associated with rapidly growing mycobacteria (RGM) have been increasingly reported worldwide, including in Brazil. Among RGM, the *M. abscessus* complex is considered the most pathogenic, besides being related to multidrug resistance. Considering the importance of investigating the RGM strains present in our state, this study aimed to characterize the molecular and susceptibility profile of RGM isolates referred to the Reference Center for Mycobacteria State (Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública, IPB-LACEN/RS). Furthermore, the mechanisms of quinolone resistance conferred by *gyrA* and *gyrB* genes were evaluated. A total of 74 isolates was sent to IPB-LACEN/RS between 2007 and 2012. Forty-three of the analyzed isolates were related to outbreak and 31 isolates of RGM were unrelated to outbreaks. The technique of PRA- *hsp65* identified 43 isolates as *M. abscessus* type 2, 21 isolates as *M. fortuitum* type 1 and 10 isolates as *M. abscessus* type 1. The partial sequencing of the *rpoB* gene confirmed the identification of *M. abscessus* type 2 as *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* type 1 as *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. fortuitum* type 1 and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*. PFGE typing technique showed the same clonal profile for all isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii* which belongs to clone BRA100, already described worldwide. Isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* showed distinct PFGE profiles. The antibiotic susceptibility profile was evaluated by broth microdilution according to CLSI (2011), and all isolates were susceptible to amikacin and resistant to doxycycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. All isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii* were resistant to ciprofloxacin, moxifloxacin and tobramycin and presented variable susceptibility pattern to ceftazidime (Susceptible - 28%, Intermediate - 72%) and clarithromycin (Susceptible - 86%, Resistant - 14%). It is important to mention that this is the first report of clarithromycin resistance for

clone BRA100. Strains of *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* were all resistant to clarithromycin, and presented a variable susceptibility profile to cefoxitin and tobramycin. All isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* were susceptible to ciprofloxacin, in contrast to isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus* that showed a resistance rate of 70%. All RGM ciprofloxacin non-susceptible presented an Ala-83 in GyrA, contrasting to a Ser-83 in all isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* susceptible to ciprofloxacin, however, with a variable resistance profile to moxifloxacin. No difference was found in GyrB, regardless of the RGM susceptible profile. In conclusion, our study reports the persistence of a single clone of *M. abscessus* subsp. *bolletii* BRA100 related to outbreak, highly resistant, even after national implementation of infection control measures to contain outbreaks by NTM. It was also possible to correlate that mutations in the amino acid Ala-83 of GyrA are directly related to ciprofloxacin and moxifloxacin resistance in *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

Keywords: rapidly growing mycobacteria; outbreaks of postsurgical infections; quinolone resistance.

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Classificação das espécies de Micobactérias de acordo com o potencial patogênico. .....	18
Tabela 2: Classificação das MCR conforme grupos .....	19
Tabela 3: Classificação das MNT de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento .....	21

## **Lista de Figuras**

Figura 1: Fluxo para identificação de micobactérias segundo Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (2008). .....	27
--	----

## Lista de Abreviaturas

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMA	Complexo <i>M. avium</i>
CMT	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
FQ	Fluoroquinolonas
IPB-LACEN	Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MIRU-VNTR	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Eletroforesis</i>
PRA	PCR - <i>Restriction Enzyme Analysis</i>
QRDR	<i>Quinolone-Resistance-Determining Regions</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rRNA	RNA ribossomal

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Características das MNT.....	20
2.2 Transmissão de MNT.....	22
2.3 Doença causada por MNT.....	23
2.5 Diagnóstico da Doença.....	25
2.6 Identificação de MNT.....	26
2.7 Métodos Moleculares para MNT.....	28
2.7.1 Identificação pelo método PCR- Restriction Enzyme Analysis (PRA).....	29
2.7.2 Sequenciamento do DNA.....	30
2.8 Epidemiologia Molecular.....	30
2.8.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	31
2.8.2 Outros métodos de tipagem.....	31
2.9 Teste de suscetibilidade por Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	32
2.10 Resistência aos fármacos.....	32
2.10.1 Mecanismos de resistência às quinolonas.....	33
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
4 OBJETIVOS.....	46
4.1 Objetivo Principal.....	46
4.2 Objetivos Secundários.....	46
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	47
5.1 MANUSCRITO I - Outbreaks due to <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> in Southern Brazil: Persistence of a single clone from 2007 to 2011.....	47

5.2 MANUSCRITO II - Mutations in <i>gyrA</i> and <i>gyrB</i> genes confer quinolone resistance in <i>Mycobacterium fortuitum</i> and <i>Mycobacterium abscessus</i> complex.....	68
6 CONCLUSÕES GERAIS .....	89
7 ANEXOS.....	90
ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	91
ANEXO II - Folha de Rosto CONEP.....	92
ANEXO III - Trabalhos Publicados em Colaboração .....	93



## 1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência de tuberculose em nosso meio não propiciou ainda a oportunidade de estudos locais detalhados de doenças causadas por outras espécies de micobactérias. A partir do aumento de casos da co-infecção TB/AIDS e ocorrência de surtos, surgiu um maior interesse em conhecer as espécies de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) circulantes no Brasil. As MNT, encontram-se amplamente distribuídas no meio ambiente e nos últimos 20 anos, infecções causadas por estes microrganismos tornaram-se relativamente mais frequentes, relacionada ou não com quadros de imunodepressão.

Devido às similaridades fenotípicas e genotípicas faz-se necessário a aplicação e desenvolvimento de metodologias que melhor caracterizem as MNT, esta irá fornecer informações para aprimorar o diagnóstico das diversas infecções associadas a estas micobactérias o que permitirá estabelecer estratégias à serem utilizadas para o controle e tratamento das micobacterioses. Assim, deve-se fazer o uso de metodologias que permitam estudar e caracterizar os isolados, facilitando a compilação e avaliação dos resultados.

Este estudo utilizou metodologias baseadas em biologia molecular para realizar a identificação e caracterização de espécies de MNT. Assim, esta proposta visou agregar ao diagnóstico bacteriológico convencional (métodos fenotípicos) a novas técnicas a partir dos conhecimentos da genética dos microrganismos (métodos genotípicos), bem como teste de suscetibilidade das MNT.

Os avanços científicos e tecnológicos ainda não foram capazes de controlar totalmente as MNT, fazendo com que estas micobactérias permaneçam como um importante problema. Aliado a relatos epidemiológicos crescentes, e ao aumento de cepas resistentes a múltiplos antibióticos vem crescendo em todo o mundo, diminuindo as possibilidades de tratamento.

Estratégias de controle como o estabelecimento de normas, utilização de métodos de diagnósticos mais rápidos e precisos, regimes de tratamento, precisam ser melhorados. Visto isto, este estudo visa aprofundar o conhecimento sobre as espécies de MNT circulantes no estado do Rio Grande do Sul, bem como os diferentes perfis de susceptibilidade, mutações e genótipos que ocorrem em isolados clínicos de micobactérias de crescimento rápido (MCR).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A família *Mycobacteriaceae*, que faz parte da ordem *Mycobacteriales*, possui um único gênero, o *Mycobacterium* que é composto por cerca de um número crescente de novas espécies. Atualmente existem 169 espécies e 13 subespécies reconhecidas oficialmente as quais estão distribuídas pelos diversos ambientes (1), sendo que grande parte (1/3) destas espécies está associada a doenças no homem e animais (2, 3).

Estudos taxonômicos demonstraram similaridades fenotípicas, relação de antígenos citoplasmáticos e homologia do DNA, entre as várias espécies oficialmente descritas induzindo, por razões operacionais de diagnóstico e do fato de causarem o mesmo espectro de doenças, o agrupamento em complexos ou grupos. O principal complexo de importância clínica é o Complexo *M. tuberculosis* (CMT) o qual engloba as espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* – BCG; *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (1, 4).

Com base em critérios clínicos as micobactérias são divididas em três grupos. O primeiro grupo inclui patógenos estritos ao homem e animais e geralmente não são encontrados no meio ambiente: CMT e *M. leprae*. O segundo grupo consiste em micobactérias que se encontram na natureza e que sob certas circunstâncias podem se tornar patogênicas (oportunistas ou potencialmente patogênicas). O terceiro grupo inclui as micobactérias saprófitas ou não patogênicas ou ainda excepcionalmente patogênicas (Tabela 1) (5). As micobactérias oportunistas e as saprófitas são chamadas de micobactérias não tuberculosas (MNT), encontram-se amplamente distribuídas no meio ambiente e nos últimos 20 anos, infecções causadas por estes microrganismos tornaram-se relativamente mais frequente, relacionada ou não com quadros de imunodepressão (6).

**Tabela 1: Classificação das espécies de Micobactérias de acordo com o potencial patogênico.**

<b>Patogênicas</b>	<b>Potencialmente patogênicas</b>	<b>Raramente Patogênicas</b>	
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. komossense</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. lentiflavum</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. alvei</i>	<i>M. lepraemurium</i>
<i>M. microti</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. madagascariense</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. mageritense</i>
	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. moriokaense</i>
	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. brumae</i>	<i>M. mucogenicum</i>
	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. neoaurum</i>
	<i>M. kansasii</i>	<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
	<i>M. malmoense</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. obuense</i>
	<i>M. genavense</i>	<i>M. confluentis</i>	<i>M. parafortuitum</i>
	<i>M. marinum</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. phlei</i>
	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. cookii</i>	<i>M. porcinum</i>
	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. poriferae</i>
	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. pulveris</i>
	<i>M. simiae</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. rhodesiae</i>
	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. senegalense</i>
	<i>M. szulgai</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. smegmatis</i>
	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. sphagni</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. terrae</i>
		<i>M. gilvum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
		<i>M. gordonae</i>	<i>M. tokaiense</i>
		<i>M. hassiacum</i>	<i>M. triplex</i>
		<i>M. hiberniae</i>	<i>M. triviale</i>
		<i>M. hodleri</i>	<i>M. vaccae</i>
		<i>M. interjectum</i>	

Fonte: Adaptado de Leao *et al.*, 2004 (5).

Além do CMT, existem as micobactérias de crescimento lento (MCL) sendo o Complexo *M. avium* (CMA) o seu principal grupo. As espécies do CMA podem ser transmitidas de animais para humanos (7). Este complexo agrupa as subespécies *M. avium* subsp. *avium*, subsp. *silvaticum*, subsp. *hominissuis*, e subsp. *paratuberculosis*, bem como as espécies *M. intracellulare*, *M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bouchedurhonense*, e *M. ituriense* (8). O complexo *M. terrae* agrupa as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*. Recentemente, algumas espécies de micobactérias de crescimento rápido (MCR) foram reunidas em três grupos: (i) grupo *M. fortuitum* composto pelas espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense* e *M. bonickei*; (ii) grupo *M. chelonae* pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* e (iii) grupo *M. smegmatis*, pelas espécies *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii* (9) (Tabela 2).

**Tabela 2: Classificação das MCR conforme grupos**

<b>Grupo <i>M. fortuitum</i></b>	<b>Grupo <i>M. chelonae/abscessus</i></b>	<b>Grupo <i>M. smegmatis</i></b>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. peregrinum</i> tipo 1	<i>M. abscessus</i>	<i>M. wolinskyi</i>
<i>M. peregrinum</i> tipo 2	<i>M. immunogenum</i>	<i>M. goodii</i>
<i>M. houstonense</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	

Fonte: Adaptado de Brown-Elliott & Wallace 2002 (9).

## 2.1 Características das MNT

Atualmente existem mais de 150 espécies reconhecidas de MNT, que são membros de ambos os grupos de MCL e MCR. Em parte, o aumento no número de espécies de MNT está relacionado a pacientes com AIDS. Além disso, o advento de métodos de biologia molecular, em particular o sequenciamento de DNA, permitiu a diferenciação de isolados não identificáveis por métodos fenotípicos tradicionais (8).

As MNTs compartilham características comuns: 1) são patógenos facultativos; 2) não existe evidência de transmissão pessoa-a-pessoa; 3) algumas espécies de MNT são onipresentes e outras têm distribuição mais restrita; 4) tratamento pode ser difícil e varia de acordo com o organismo envolvido e local da doença; e 5) patogênese ainda está indefinida, dependendo da interação entre o microorganismo e o sistema imunológico do hospedeiro (10).

As micobactérias têm forma bacilar, são aeróbias, têm alto conteúdo G+C (62 a 70%), e resistem à descoloração com álcool-ácido, em função do alto conteúdo lipídico de sua parede celular. 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 MCL apresentam crescimento após acima de 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).

As MNTs podem ser classificadas conforme Runyon (11), o qual separou em grupos de I a IV de acordo com o tempo de crescimento e a produção de pigmento (Tabela 3).

**Tabela 3: Classificação das MNT de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento**

<b>Grupo</b>	<b>Pigmentação e tempo de crescimento</b>	<b>Sigla</b>
I	Caracterizam-se pelo crescimento lento das colônias e por serem fotocromógenas (colônias que desenvolvem pigmento amarelo somente quando expostas à luz). Ex: <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> .	CLF
II	Caracterizam-se pelo crescimento lento das colônias e por serem escotocromógenas (colônias que desenvolvem pigmento tanto na luz como no escuro). Ex: <i>M. gordonae</i> , <i>M. szulgai</i> .	CLE
III	Caracterizam-se pelo crescimento lento das colônias e por serem acromógenas (colônias não produzem pigmento). Ex: <i>M. avium</i> , <i>M. terrae</i> .	CLA
IV	Caracterizam-se pelo crescimento rápido das colônias sendo que as colônias podem ser pigmentadas ou não. Ex: <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> .	CRF CRE CRA

Fonte: Adaptado de Runyon 1959 (11).

As espécies de MNT têm sido isoladas de diversas fontes ambientais (águas, solos, poeiras e materiais vegetais) ou de animais. Algumas espécies são encontradas na própria microbiota epidérmica e do trato respiratório e gástrico-intestinal dos seres humanos (12).

A ubiquidade dessas espécies no ambiente, particularmente em água e ambientes úmidos, contribui para o fato de que as espécies *M. chelonae* e *M. abscessus*, e os membros do grupo *M. fortuitum* sejam as espécies mais prevalentes em infecções oportunistas em seres humanos causadas por MCR e relacionadas à infusão de soluções aquosas, ou exposição de sítios estéreis a água contaminada com micobactérias (13-16).

MNT têm extraordinária sobrevivência, que persiste apesar de baixos níveis de nutrientes na água potável encanada. Além disso, tolera temperaturas extremas (17) resultado da contaminação por MNT em água quente da torneira, spas, e máquinas de gelo, por exemplo. As espécies de CMA, *M. xenopi*, *M. phlei*, e *M. chelonae* são as mais termo

resistentes. *M. mucogenicum*, *M. kansasii*, *M. gordonae* e *M. flavescens* estão entre as espécies de MNT mais isoladas de água potável pública (18). As MNT também são encontradas nos alimentos sendo fonte de exposição para o ser humano, estudos mostram que 20% dos alimentos continham MNT nas amostras estudadas e em alguns isolados de *M. avium* mostrou homologia genética entre os isolados clínicos (19).

Além disso, MNT são capazes de formar biofilmes (*M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. avium*), o que permite que estas micobactérias possam persistir em um sistema de fluxo (por exemplo, sistema de distribuição de água) apesar de seu crescimento lento (2). Dentre as espécies do grupo *M. chelonae-abscessus*, *M. massiliense*, foi recuperada a partir de um trocater utilizado numa colecistectomia realizada em um hospital no Rio de Janeiro durante o período de epidemia (20). As demais espécies de MNT apresentam característica mais ubiqüitária sendo encontradas em água potável, biofilmes em tubulações de sistemas de distribuição de água potável, piscinas, esgoto, solo, e superfície de artigos hospitalares (21). Carson e colaboradores demonstraram que *M. chelonae* ATCC 14472, quando incubada em água destilada estéril a 25°C, é capaz de multiplicar-se e manter viabilidade por um mínimo de 30 dias (22). Além da capacidade de multiplicação e sobrevivência em condições de escassez de nutrientes, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. immunogenum* podem ser resistentes ao cloreto de benzalcônio, compostos organo-mercuriais, cloro, glutaraldeído e clorexidina (23-25).

## **2.2 Transmissão de MNT**

MNT são patógenos humanos oportunistas ambientais, cujos reservatórios incluem solo rico em matéria orgânica e água potável em prédios e domicílios. De fato, os seres humanos são provavelmente cercados por MNT, em particular em sistemas de distribuição de



água potável e de água para uso doméstico, aderem-se a superfícies de encanamentos bem como a capacidade desinfetante-resistente, capaz de crescer em baixas concentrações de matéria orgânica (3, 8).

As possíveis vias de infecção por MNT a partir dos seus reservatórios incluem 1) a ingestão de solo ou água por crianças, conduzindo a linfadenite cervical; 2) a inalação de aerossóis com MNT por adultos levando à infecção pulmonar; 3) inalação de poeiras de solos que levam à doença pulmonar; 4) ingestão de MNT pelo estômago, e sua entrada no pulmão através da aspiração devido ao refluxo levando à infecção pulmonar; e 5) a ingestão oral de MNT pela água por pacientes com imunodeficiência profunda e redução da barreira do trato gastrointestinal (8).

Infecções hospitalares e surtos causados por desinfecção/esterilização inadequadas de dispositivos médicos ou contaminação ambiental de medicamentos também já foram descritas (20, 26-29). Essas infecções têm ocorrido principalmente em hospitais, onde os pacientes com imunidade reduzida estão mais expostos. No entanto, parece que a infecção por MNT pode quase que exclusivamente estar associada a micobactérias ambientais que se adaptaram a seres humanos (30).

As MNT também são responsáveis por doenças que acometem pacientes que ficam expostos ou em contato prolongado com ambientes aquáticos, causando ferimentos ou micro-traumas na pele. Casos de granulomas na pele foram descritos em pacientes infectados pelo *M. marinum* através da manipulação de peixes em águas contaminadas (31).

### **2.3 Doença causada por MNT**

Quando responsáveis por processos patológicos em humanos, as MNT podem acometer qualquer tecido dos sistemas ou disseminar-se por todo o organismo, principalmente

em pacientes imunocomprometidos. A doença que ocasionam é denominada de micobacteriose, independentemente da espécie de MNT responsável pela patologia.

Infecções pulmonares causadas por MNT estão frequentemente envolvidas com fibrose pulmonar crônica de várias etiologias, doenças respiratórias obstrutivas crônicas e bronquiestasias. As micobacterioses mais comuns são infecções extrapulmonares com adenopatia cervical (linfadenopatia) benigna em crianças, lesões na pele e doenças disseminadas em pessoas imunocomprometidas. As micobacterioses podem causar também infecção óssea, artrite, bursite (32).

Por não serem transmissíveis pessoa-pessoa, não existe obrigatoriedade de notificação, o que torna o indicador de incidência no Brasil desconhecido (12). Diante da necessidade de consolidação nacional do perfil epidemiológico e sanitário dos surtos ocorridos e do desencadeamento de respostas rápidas e proporcionais ao perfil de cada evento, fez-se necessário o estabelecimento de um fluxo padronizado de notificação, para todas as instituições, se tornando compulsória a notificação, por profissionais e instituições de saúde pública ou privada, de todo e qualquer caso de infecção por micobactéria a partir de sítio cirúrgico (33).

O reconhecimento das MNT como patógenos do pulmão em hospedeiros imunocompetentes é muitas vezes subestimado pois apresenta causa insidiosa, misteriosa e sintomas inespecíficos (10). No entanto, um número crescente de relatos de casos documentando o espectro de doenças causadas por estas bactérias em indivíduos saudáveis aumentou nas últimas duas décadas. A expressão mais comum de infecção por MNT em crianças imunocompetentes é a linfadenite, visto que a doença pulmonar tem sido uma ocorrência relativamente rara. No entanto, casos de infecção endobrônquica por MNT em crianças imunocompetentes também foram relatados (34). A maioria das pessoas imunocompetentes pode resistir a infecções por estes organismos, sem haver invasão dos

tecidos. No entanto, a doença disseminada devido as MNT está entre as infecções mais comuns e graves em pessoas com infecção avançada pelo HIV. Embora tenha sido relatado um número de diferentes espécies de MNT, a grande maioria (90%) destas infecções são causadas por CMA, com mais do que 90% destas infecções devidas a *M. avium* (35).

## 2.4 Diagnóstico da Doença

O contínuo crescimento no número e na prevalência de espécies de MNT, e os recentes avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento para a doença causada por esses agentes levaram ao padrão atualizado de diagnóstico e terapêutica que trata exclusivamente com as MNT.

O diagnóstico de infecções por micobactérias é baseado em testes fenotípicos (tempo de crescimento, produção ou não de pigmentos e provas bioquímicas) e testes moleculares (PCR, restrição enzimática e sequenciamento) (36). Em algumas situações, a identificação a nível de espécie destes microrganismos torna-se difícil devido à similaridade encontrada entre elas.

Ao longo dos últimos anos, a prevalência de doenças humanas causadas por MNT tem aumentado. Se o aumento dos casos é real ou se mais casos estão sendo reconhecidos permanece obscuro. Apesar de um aumento considerável no conhecimento sobre infecções por MNT, elas ainda representam um desafio no diagnóstico e terapêutica, por várias razões: 1) como são bactérias oportunistas, seu isolamento a partir de sítios humanos não-estéreis não configura processo infeccioso; 2) a identificação imediata e fiável de determinadas espécies depende de uma comunicação adequada entre clínicos e profissionais do laboratório; 3) falta de testes padronizados de susceptibilidade; e 4) a falta de diretrizes de tratamento expõe os pacientes a drogas tóxicas e a resultados decepcionantes. Laboratórios de pesquisa e estudos

multicêntricos controlados são necessários para melhorar o diagnóstico e tratamento dessas infecções (37).

A *American Thoracic Society* (ATS) estabeleceu critérios para determinar o significado clínico das MNT, já que várias espécies fazem parte da microbiota normal transitória do trato respiratório humano. A ATS recomenda que o diagnóstico dessas doenças seja feito com base em uma série de critérios bacteriológicos, clínicos e radiológicos. Por essa razão, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica (7, 38). Vários fatores aumentam a probabilidade de significância clínica de isolados de MNT, incluindo a recuperação de espécies múltiplas, a recuperação do organismo em grandes quantidades, ou a recuperação de isolados de MNT de um local normalmente estéril, como o sangue, biópsia.

Critérios clínicos e microbiológicos estabelecidos para doença pulmonar incluem: sintomas pulmonares, nódulos ou opacidades cavitárias na radiografia de tórax, que mostra bronquiectasia multifocal com múltiplos pequenos nódulos; resultados de cultura positivos de pelo menos duas amostras de escarro obtidos em momentos diferentes do mesmo paciente ; cultura positiva de pelo menos uma amostra de lavado brônquico alveolar (LBA) (7). Um caso clínico de doença pulmonar não pode ser associado a infecção por MNT se uma única cultura for positiva e a pesquisa de BAAR for negativa ou com baixo número de bacilos (39).

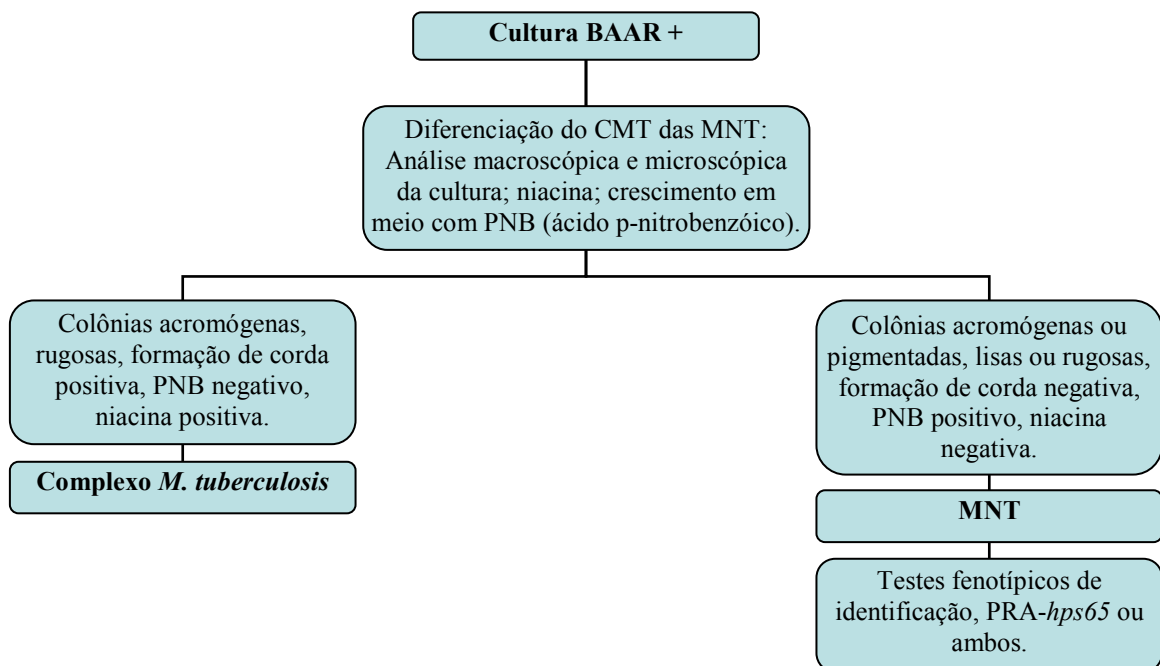
## **2.5 Identificação de MNT**

Identificação de micobactérias em nível de espécie é tradicionalmente realizada por avaliação das características morfológicas e bioquímicas do organismo. Isto é, no entanto, um demorado e penoso processo quando se trata do gênero *Mycobacterium* sendo que a

identificação precisa muitas vezes não é possível devido ao aumento do número de espécies com sobreposição de características fenotípicas (40).

Devido às diferenças de sensibilidade aos antimicrobianos que determinam as opções de tratamento, identificação em nível de espécies de MNT está se tornando cada vez mais importante (7). Portanto, a identificação da maioria dos isolados de micobactérias em nível de espécie e não apenas como grupos é fortemente recomendada (41).

Os métodos para identificação de micobactérias são compostos inicialmente de testes para separação do CMT das MNT. A identificação pode ser realizada através de testes fenotípicos (baseados em características culturais e bioquímicas) e testes genotípicos (metodologias moleculares de identificação) ( Figura 1) (36).



**Figura 1: Fluxo para identificação de micobactérias segundo Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (2008) (12).**

## 2.6 Métodos Moleculares para MNT

Os métodos moleculares tornaram-se ferramentas valiosas nas investigações epidemiológicas de surtos, pseudo-surtos e epidemias envolvendo MNT. Se um laboratório que realiza os métodos moleculares de isolados MNT não pode facilmente identificá-lo, o clínico ou investigador deve contatar o departamento do estado da Saúde ou o Centro de Referência para aconselhamento sobre os laboratórios que podem ajudar com esta análise.

O desenvolvimento de testes moleculares acelerou o diagnóstico, mas a maioria dos métodos ainda são caros e tecnicamente exigentes (42), as técnicas disponíveis utilizadas são sondas genéticas (43), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (44), testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (45), PCR em tempo real, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), sequenciamento de DNA (46, 47).

Durante a última década, buscando rapidez e praticidade foram desenvolvidos sistemas comerciais baseados em sondas genéticas. Os principais sistemas que estão disponíveis são o AccuProbe<sup>®</sup> (Gen-Probe Inc., USA) e o INNO-LiPA Mycobacterium<sup>®</sup> (Innogenetics NV, Bélgica) os quais são alternativas importantes para o laboratório de diagnóstico, mas caracterizam um número limitado de espécies (42, 43, 48, 49). Atualmente existe o sistema de sonda GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM (Hain LifeScience<sup>®</sup>), que permitem a identificação de várias espécies de micobactérias: *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. xenopi* e CMT (50, 51).

### 2.6.1 Identificação pelo método PCR- Restriction Enzyme Analysis (PRA)

O método atual de PRA amplamente adotado para a identificação de MNT baseia-se na amplificação por PCR de uma sequência de 441 pb do gene que codifica a proteína 65 kD de choque térmico (*hsp65*) seguido pela digestão com enzima de restrição (52). O tamanho dos fragmentos de restrição é geralmente espécie-específico (53). Este método tem sido utilizado para o diagnóstico (52, 54), avaliações taxonômicas (55), e caracterização dos isolados com novas características (56).

Em um estudo, 100% das 129 MCR não pigmentadas foram identificados usando PRA. No entanto, alguns táxons podem exigir endonucleases adicionais para identificação de espécies (57). Originalmente, a identificação de um algoritmo de PRA para 24 espécies diferentes de *Mycobacterium* foi desenvolvido (52), o qual foi, posteriormente, ampliado para 54 espécies diferentes (58). O método de PRA é relativamente rápido, não requer organismos viáveis, e identifica muitas espécies de MNT que não são identificáveis por técnicas fenotípicas, no entanto, este sistema não está disponível comercialmente (7).

Devido ao crescente número de alelos *hsp65* sendo descritos na literatura, a interpretação visual é cada vez mais complexa e o uso de software para reconhecimento dos padrões para identificação de um número limitado de espécies de MNT já havia sido sugerido em 1992 (59). Por isso, construiu-se um banco de dados com os padrões obtidos com *BstEII* e *HaeIII* para isolados de referência e clínicos com o software GelCompar (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

### 2.6.2 Sequenciamento do DNA

Técnica mais específica, considerada o padrão-ouro dentre os métodos de biologia molecular para identificação das espécies de micobactérias. Esta metodologia é baseada no sequenciamento de fragmentos de alguns genes conservados que são importantes para a diferenciação das espécies – *hsp65*, *rpoB* e 16S rRNA (41, 45, 46).

Dentre os genes descritos acima, o sequenciamento do gene *hsp65* e *rpoB* são os mais utilizados e permitem a identificação a nível de espécie e subespécie. Este método pode ser utilizado para confirmar e refinar o resultado obtido pelo PRA-*hsp65* (60).

Atualmente o gene *rpoB*, gene de cópia simples que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, tem sido considerado o mais adequado para classificar taxonomicamente as micobactérias (61) e reconhecer micobactérias com potencial para doenças invasivas (62).

O 16S rRNA é um gene com as regiões altamente conservadas comum a todos os organismos e também com áreas onde ocorrem variações nucleotídicas. Para fins de identificação de micobactérias, a análise das sequências concentra-se em duas sequências hipervariáveis conhecidas como regiões A e B (36). O principal problema com este método é que, espécies recentemente descritas contem alta similaridade nas sequências do gene 16S rRNA. Por exemplo, a diferença entre *M. szulgai* e *M. malmoense* é de dois nucleotídeos, embora seja bem estabelecido que estas são duas espécies distintas (63).

## 2.7 Epidemiologia Molecular

Um aspecto importante do uso da epidemiologia molecular no estudo de doenças infecciosas é estabelecer padrões epidemiológicos mais precisos. Assim, com os dados obtidos a partir destes estudos, podemos responder perguntas relacionadas a clonalidade de



cepas, estabelecer relações filogenéticas, identificar a origem e rastrear microrganismos envolvidos em um surto.

### *2.7.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*

O PFGE é, provavelmente, a técnica mais utilizada como método de tipagem molecular de MNT. Esta técnica se baseia na incorporação dos isolados em gel de agarose, lise da célula bacteriana, e digestão do DNA cromossômico com enzimas de restrição específicas e posterior corrida em gel de agarose utilizando equipamento com capacidade de separar fragmentos de DNA com alto peso molecular (64, 65).

Este é um procedimento demorado, porque requer que os organismos devam ser cultivados em meio de cultura líquido até gerar biomassa suficiente para produzir DNA em quantidades necessárias. Além disso, mais da metade do DNA de cepas de *M. abscessus* espontaneamente degradam ou são digeridas durante o procedimento da eletroforese, embora isso possa ser corrigido com a adição de tiouréia para estabilizar o tampão de corrida (64, 65).

Isolados clínicos de MNT da mesma espécie mas não relacionados geneticamente (clones ou tipos diferentes) apresentam perfis de PFGE altamente heterogêneos enquanto que uma mesma cepa de MNT apresenta perfis idênticos ou indistinguíveis (66, 67).

### *2.7.2 Outros métodos de tipagem*

Outros métodos têm sido utilizados para a comparação de cepas, incluindo *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR)* (68), *Multilocus Sequence Typing (MLST)* (69).

## 2.8 Teste de suscetibilidade por Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Testes de suscetibilidade são indicados para qualquer MCR que é considerada clinicamente significativa (por exemplo, os isolados de sangue, tecido, pele e lesões de tecidos moles), bem como para CMA, *M. kansasii* e *M. marinum*. Estas micobactérias foram selecionadas porque existem dados suficientes para fundamentar suas recomendações (7, 70).

A declaração sobre o diagnóstico e tratamento de doenças causadas por MNT emitido pela ATS, sugere que as seguintes drogas devam ser testadas contra MCR clinicamente significativos: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina (ou minociclina), imipenem, linezolida, moxifloxacino, sulfametoxazol-trimetoprim e tobramicina (7, 70), e o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomenda como norma que o método de microdiluição em caldo seja utilizado para o teste de susceptibilidade de grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* (70). Os resultados dos testes são obtidos em três a cinco dias e os valores de CIM e a interpretação dos resultados são baseados em tabelas fornecidas pelo CLSI.

Devido a incidência de infecção de MNT não ser tão alta, no Brasil apenas poucos centros de referência são capazes de oferecer o teste de susceptibilidade de cepas clinicamente significativas como um serviço.

## 2.9 Resistência aos fármacos

Embora a micobacteriose seja uma doença curável, o tratamento necessário para curar a doença é bastante longo e ainda apresenta significativo risco de toxicidade e efeitos adversos. Esses fatores fazem com que a adesão do paciente ao tratamento seja difícil, e essa não-

adesão, frequentemente, seleciona bactérias resistentes às drogas. Assim como, a prescrição errônea por parte do médico e o uso em monoterapia, também podem selecionar cepas resistentes (7).

As MNT são naturalmente resistentes a muitos antibióticos devido, principalmente, ao envelope altamente hidrofóbico, que atua como uma barreira para muitos compostos (71). Vários determinantes de resistência são também codificados pelo genoma. Isso inclui enzimas hidrolíticas ou modificadoras de drogas como as  $\beta$ -lactamases e acetil-aminoglicosídeo-transferases e bombas de efluxo de drogas (72).

Para bactérias em geral, a resistência adquirida pode ser devido a mutações (mutações pontuais, deleções, inserções, etc...) ou por transferência genética horizontal. Em MNT ainda não foi descrito nenhum elemento genético móvel, como plamídeos e transposons, que são conhecidos por mediar a resistência aos antibióticos em várias espécies bacterianas (73). Por isso, o desenvolvimento da resistência neste grupo de microrganismo depende basicamente de alterações genéticas no genoma da bactéria (74). A resistência das MNT às drogas é consequência de mutações espontâneas nos genes que codificam o alvo do antimicrobiano ou enzimas envolvidas na sua ativação. As mutações associadas à resistência já foram descritas para vários compostos e a resistência a múltiplos antimicrobianos ocorre devido a aquisição sequencial de mutações em diferentes genes, também usualmente selecionadas por um tratamento inadequado (74-76).

### *2.9.1 Mecanismos de resistência às quinolonas*

As quinolonas são potentes drogas recomendadas para o tratamento de MNT, o alvo principal das quinolonas é a DNA girase, uma topoisomerase do tipo II composta por duas subunidades A codificada pelo gene *gyrA* e duas subunidades B codificada pelo gene *gyrB*

(77). Na célula, as topoisomerasas regulam o superenrolamento das fitas de DNA para atender as necessidades da transcrição e replicação, as quinolonas atuam inibindo o superenrolamento do DNA impedindo sua replicação (78, 79).

Regiões conservadas nas subunidades A e B da DNA girase que estão envolvidas na resistência a quinolonas, são referidas como *quinolone-resistance-determining regions* (QRDR) (80). Mutações nas QRDR desses genes é o mecanismo primário de desenvolvimento da resistência as quinolonas (81). As sequências de peptídeos de GyrA QRDR se estende a partir de resíduos de aminoácidos 67-106, e GyrB QRDR estende-se a partir de resíduos de aminoácidos 436-464 (numeração usada no sistema para *E. coli*).

As mutações em QRDR *gyrA* tem sido identificadas em uma alta proporção de cepas resistentes a ciprofloxacino e moxifloxacino, principalmente atribuídas as posições no códon 83 e 87 (75), já mutações em *gyrB* são encontradas em menor proporção, atribuídas as posições no códon 426, 447 e 464 (73, 81-83).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Euzéby JP. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterionet/-newshtml>. 2014.
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, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, 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. Leao SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, et al. *Practical Handbook for the Phenotypic and Genotypic Identification of Mycobacteria*. 2004.
6. 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.
7. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007; 175(4):367-416.
8. 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.
9. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15(4):716-46.

10. Falkinham JO, 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; 9(2):177-215.
11. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical Clinics of North America*. 1959; 43(1):273-90.
12. Brasil. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Ministério da Saúde. 2008; 1:436.
13. Meyers H, Brown-Elliott BA, Moore D, Curry J, Truong C, Zhang Y, et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 34(11):1500-7.
14. Tiwari TS, Ray B, Jost KC, Jr., Rathod MK, Zhang Y, Brown-Elliott BA, et al. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36(8):954-62.
15. Villanueva A, Calderon RV, Vargas BA, Ruiz F, Agüero S, Zhang Y, et al. Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Clinical Infectious Diseases*. 1997; 24(6):1147-53.
16. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 1998 ;52:453-90.
17. Schulze-Robbeke R, Buchholtz K. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992; 58(6):1869-73.

18. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68(11):5318-25.
19. Yoder S, Argueta C, Holtzman A, Aronson T, Berlin OG, Tomasek P, et al. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65(6):2650-3.
20. Duarte RS, Lourenço MC, Fonseca LeS, Leão SC, Amorim EeL, Rocha IL, et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(7):2149-55.
21. Reali D, Deriu MG, Baldi P, Baggiani A, Pinto B. Mycobacteria in swimming pool water and the meaning of microbiological conventional indicators. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunita*. 2004; 16(1-2):247-53.
22. Carson LA, Petersen NJ, Favero MS, Agüero SM. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978; 36(6):839-46.
23. Wilson RW, Steingrube VA, Bottger EC, Springer B, Brown-Elliott BA, Vincent V, et al. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; 51(Pt 5):1751-64.
24. Fraud S, Maillard JY, Russell AD. Comparison of the mycobactericidal activity of ortho- phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. *The Journal of Hospital Infection*. 2001; 48(3):214-21.
25. Lorena NS, Pitombo MB, Côrtes PB, Maya MC, Silva MG, Carvalho AC, et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance

to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2010; 25(5):455-9.

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

27. Leao SC, Viana-Niero C, Matsumoto CK, Lima KV, Lopes ML, Palaci M, et al. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. *Future Microbiology*. 2010;5(6):971-80.

28. Cardoso AM, Martins de Sousa E, Viana-Niero C, Bonfim de Bortoli F, Pereira das Neves ZC, Leão SC, et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes and Infection*. 2008; 10(14-15):1552-7.

29. Viana-Niero C, Lima KV, Lopes ML, Rabello MC, Marsola LR, Brilhante VC, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(3):850-5.

30. Senna SG, Battilana J, Costa JC, Silva MG, Duarte RS, Fonseca LS, et al. Sequencing of *hsp65* gene for identification of *Mycobacterium* species isolated from environmental and clinical sources in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(11):3822-5.

31. Stamm LM, Brown EJ. *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium. *Microbes and Infection*. 2004; 6(15):1418-28.

32. Kennedy MP, O'Connor TM, Ryan C, Sheehan S, Cryan B, Bredin C. Nontuberculous mycobacteria: incidence in Southwest Ireland from 1987 to 2000. *Respiratory Medicine*. 2003; 97(3):257-63.



33. 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 - GGTES, 2011.
34. Nolt D, Michaels MG, Wald ER. Intrathoracic disease from nontuberculous mycobacteria in children: two cases and a review of the literature. *Pediatrics*. 2003; 112(5):e434.
35. Horsburgh CR, Jr., Gettings J, Alexander LN, Lennox JL. Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33(11):1938-43.
36. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; 16(2):319-54.
37. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerging Infectious Disease*. 2009; 15(9):1351-8.
38. van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013; 34(1):103-9.
39. Woods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 2000; 31(5):1209-15.
40. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34(2):296-303.
41. da Silva Rocha A, Werneck Barreto AM, Dias Campos CE, Villas-Boas da Silva M, Fonseca L, Saad MH, et al. Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as

determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40(11):4191-6.

42. Suffys PN, da Silva Rocha A, de Oliveira M, Campos CE, Barreto AM, Portaels F, et al. Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(12):4477-82.

43. Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, Cichero P, Farina C, Mucignat G, et al. Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(3):1079-84.

44. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. Clinical Microbiology Reviews. 2001; 14(4):704-26.

45. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31(2):175-8.

46. Adekambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41(12):5699-708.

47. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41(4):1447-53.

48. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Piersimoni C. Direct identification of mycobacteria from MB/BacT alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(9):3222-7.

49. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, et al. Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(2):651-7.
50. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* Assay for identification of mycobacterial species from cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(5):1769-75.
51. Couto I, Machado D, Viveiros M, Rodrigues L, Amaral L. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010; 16(8):1161-4.
52. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(1):79-85.
53. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, et al. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33(1):149-53.
54. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(11):2969-73.
55. Picardeau M, Prod'Hom G, Raskine L, LePennec MP, Vincent V. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(1):25-32.

56. Oliveira RS, Sircili MP, Ueki SY, Telles MA, Schnabel B, Briones MR, et al. PCR-restriction enzyme analysis of a bone marrow isolate from a human immunodeficiency virus-positive patient discloses polyclonal infection with two *Mycobacterium avium* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(12):4643-5.
57. Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31(11):2882-9.
58. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(8):2799-806.
59. Plikaytis BD, Plikaytis BB, Shinnick TM. Computer-assisted pattern recognition model for the identification of slowly growing mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of General Microbiology*. 1992; 138(11):2265-73.
60. Itoh S, Kazumi Y, Abe C, Takahashi M. Heterogeneity of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences of *Mycobacterium gordonae* clinical isolates identified with a DNA probe kit and by conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(4):1656-63.
61. Adekambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006; 56(Pt 1):133-43.
62. Simmon KE, Pounder JI, Greene JN, Walsh F, Anderson CM, Cohen S, et al. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45(6):1978-80.

63. Murray PR, Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KCJ, Wallace RJJ. *Mycobacterium* phenotypic and genotypic identification. Manual of Clinical Microbiology, ed Washington, DC: ASM Press. 2003; 8(12):560-83.
64. Bosquee L, Bottger EC, De Beenhouwer H, Fonteyne PA, Hirschel B, Larsson L, et al. Cervical lymphadenitis caused by a fastidious *Mycobacterium* closely related to *Mycobacterium genavense* in an apparently immunocompetent woman: diagnosis by culture-free microbiological methods. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33(10):2670-4.
65. Realini L, Van Der Stuyft P, De Ridder K, Hirschel B, Portaels F. Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. Journal of Clinical Microbiology. 1997; 35(11):2791-4.
66. Hector JS, Pang Y, Mazurek GH, Zhang Y, Brown BA, Wallace RJ, Jr. Large restriction fragment patterns of genomic *Mycobacterium fortuitum* DNA as strain-specific markers and their use in epidemiologic investigation of four nosocomial outbreaks. Journal of Clinical Microbiology. 1992; 30(5):1250-5.
67. Burns DN, Wallace RJ, Jr., Schultz ME, Zhang YS, Zubairi SQ, Pang YJ, et al. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. The American Review of Respiratory Disease. 1991; 144(5):1153-9.
68. Christianson S, Wolfe J, Soualhine H, Sharma MK. Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria. Canadian Journal of Microbiology. 2012; 58(8):953-64.
69. Macheras E, Konjek J, Roux AL, Thiberge JM, Bastian S, Leão SC, et al. Multilocus sequence typing scheme for the *Mycobacterium abscessus* complex. Research Microbiology. 2013.

70. CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 31. 2nd edn ed. Wayne, PA, 2011.
71. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiology Letters. 1994; 123(1-2):11-8.
72. Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, et al. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996; 93(1):362-6.
73. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2009; 13(11):1320-30.
74. Normark BH, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. Journal of Internal Medicine. 2002; 252(2):91-106.
75. Cheng AF, Yew WW, Chan EW, Chin ML, Hui MM, Chan RC. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004; 48(2):596-601.
76. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 53(4):1367-76.
77. Lampe MF, Bott KF. Genetic and physical organization of the cloned *gyrA* and *gyrB* genes of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 1985; 162(1):78-84.
78. Guillemin I, Sougakoff W, Cambau E, Revel-Viravau V, Moreau N, Jarlier V. Purification and inhibition by quinolones of DNA gyrases from *Mycobacterium avium*,

*Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium fortuitum* bv. *peregrinum*. *Microbiology*. 1999; 145 ( Pt 9):2527-32.

79. Zhao X, Xu C, Domagala J, Drlica K. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(25):13991-6.

80. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997; 61(3):377-92.

81. Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, Potapova Y, Vishnevsky B, Narvskaya O, et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(8):2937-9.

82. Feuerriegel S, Cox HS, Zarkua N, Karimovich HA, Braker K, Rusch-Gerdes S, et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; 53(8):3353-6.

83. Huang TS, Kunin CM, Shin-Jung Lee S, Chen YS, Tu HZ, Liu YC. Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre: 1995-2003. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56(6):1058-62.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Principal**

Avaliar o perfil molecular e de suscetibilidade de amostras de micobactérias de crescimento rápido do Rio Grande do Sul.

### **4.2 Objetivos Secundários**

- Identificar espécies de micobactérias de crescimento rápido (MCR);
- Verificar a clonalidade das MCR;
- Determinar a suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de MCR;
- Caracterizar o mecanismo de resistência à quinolonas das MCR.



## **5 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

### **5.1 MANUSCRITO I - Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in Southern Brazil: Persistence of a single clone from 2007 to 2011**

**Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in Southern Brazil:  
Persistence of a single clone from 2007 to 2011**

Running title: *M. abscessus* subsp. *bolletii* in Southern Brazil

Luciana de Souza Nunes <sup>1,2</sup>, Ludmila Fiorenzano Baethgen <sup>3</sup>, Marta Osório Ribeiro <sup>3</sup>,  
Cássia Maria Cardoso <sup>3</sup>, Fernanda de Paris <sup>4</sup>, Simone Maria Martini de David <sup>3</sup>, Marlei  
Gomes da Silva <sup>5</sup>, Rafael Silva Duarte <sup>5</sup>, Afonso Luís Barth <sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup> *Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;* <sup>2</sup>  
*Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa  
Experimental, HCPA, Porto Alegre, Brazil;* <sup>3</sup> *Laboratório Central de Saúde Pública,  
Porto Alegre, Brazil;* <sup>4</sup> *Unidade de Pesquisa Biomédica, Serviço de Patologia Clínica,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil;* <sup>5</sup> *Instituto de Microbiologia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.*

# Corresponding Author: Afonso Luis Barth

Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Laboratório de Pesquisa  
em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, 2350  
Ramiro Barcelos St, 90035-903, Porto Alegre, Brazil.

Phone/fax: +55 (51) 33598607. E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

## Summary

Outbreaks associated to rapidly growing mycobacteria (RGM) have been increasingly reported worldwide, including in Brazil. Among the RGM, the *M. abscessus* complex is the most pathogenic and related to multidrug resistance. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility and molecular profile of RGM isolates involved in new postsurgical infections outbreaks Brazil, since 2007. From the 109 reported cases described in the state of Rio Grande do Sul, between 2007 to 2011, 43 (39%) confirmed mycobacterial growth in the culture. The clinical isolates were from biopsy or aspiration of abscesses fluids. The restriction pattern from PRA-*hsp65* identified the isolates as *M. abscessus* type 2 and *rpoB* partial sequencing, confirmed the identification as *M. abscessus* subsp. *bolletii*. These subspecies belonged to a single clone already described worldwide as BRA100, according to PFGE analysis. All isolates were susceptible to amikacin and resistant to ciprofloxacin, doxycycline, sulfamethoxazole, moxifloxacin and tobramycin. A variable susceptibility pattern was observed for cefoxitin and clarithromycin, demonstrating different susceptibility profiles compared to the previously described BRA100 clone from other Brazilian regions. Nevertheless, these isolates belonged to the single clone BRA100, according to PFGE analysis. In conclusion, our study reports the persistence of an emergent single and highly resistant clone of *M. abscessus* subsp. *bolletii* over years even after national implementation of infection control measures.

Keywords: nontuberculous mycobacteria infections; postsurgical infections outbreaks; multidrug resistance.

## Introduction

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are ubiquitous, they are able to grow on low concentrations of organic matter, such as drinking water distribution systems and building plumbing, facilitating its dissemination in different environments (Falkinham, 2013; van Ingen *et al.*, 2009). NTM are usually associated to skin and soft tissue infections, and harbor biological properties such as biofilm formation and resistance to disinfectants and antibiotics (Falkinham, 2013). The infections are commonly associated to invasive procedures involving catheters, non-sterile surgical, implantations and to the use of contaminated materials (Chu & Hu, 2013; Ivan *et al.*, 2013; Shang *et al.*, 2011; Tortoli, 2009).

Several outbreaks due to NTM have been reported worldwide in different situations including trigger point injection, injection-associated, paediatrician cardiac surgery, cosmetic surgery, acupuncture, implanted with prosthetic material, infections in ophthalmology and others (Cheng *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2008; Piersimoni & Scarparo, 2009; Song *et al.*, 2012; Viana-Niero *et al.*, 2008). The most common species to cause localized infections of the skin and subcutaneous tissues include *M. marinum* and *M. haemophilum* and the rapidly growing mycobacteria (RGM) (*M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*) (Kasperbauer & Huitt, 2013). RGM group are frequently involved in infections after traumatic injuries or surgery and are of particular concern due to the tendency to disseminate in immunocompromised patients (Falkinham, 2013; Kothavade *et al.*, 2013; Redelman-Sidi & Sepkowitz, 2010).

Recently *M. abscessus* complex has been divided into two closely related subspecies: *M. abscessus* subsp. *bolletii* (which includes *M. massiliense* and *M. bolletii*) and *M. abscessus* subsp. *abscessus* (which includes *M. abscessus*) (Euzéby, 2014;

Sampaio, 2010). And it has been observed that *M. chelonae-abscessus* group has emerged as an important cause of community- and hospital-acquired infections in humans (Koh *et al.*, 2011). Several cases of infection due to this RGM have been reported in many countries, including Brazil (Cardoso *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2009; Leao *et al.*, 2010; Monego *et al.*, 2011; Viana-Niero *et al.*, 2008).

The first outbreak reported in Brazil of *M. abscessus* subsp. *bolletii* occurred in 2004 involving 68 patients submitted to laparoscopic surgeries (Viana-Niero *et al.*, 2008). Thereafter, a series of nosocomial outbreaks have been notified in several Brazilian states, all of them associated to invasive procedures (ANVISA, 2011). Representative isolates proved to be genetically related and were identified as a single clone named BRA100 (Duarte *et al.*, 2009). The BRA100 strain is known to be resistant to high glutaraldehyde (GTA) concentrations (up to 7%), which proves that this product is non-effective against specific strains of RGM (Duarte *et al.*, 2009; Leao *et al.*, 2010; Lorena *et al.*, 2010).

The epidemiological situation in Brazil has made the Governmental Surveillance System to adopt containment actions and control. These include: analysis processes of sanitizing products in relation to the RGM susceptibility, deployment of rapid response system to report outbreaks, structuring appropriate laboratory diagnosis of RGM infections and emphasis on the application of normative Surveillance System in Brazil (ANVISA, 2011).

Although RGM has already been described in several Brazilian regions, scarce data are available from the state of Rio Grande do Sul (RS) (Leao *et al.*, 2010). Thus, the aim of this study was to evaluate the susceptibility and molecular profile of RGM isolates involved in postsurgical infections outbreaks in RS after the largest Brazilian epidemic (2006 - 2007) and Public Health measures.

## Methods

### *Isolates and microbiological procedures*

From 2007 to 2010, four outbreaks occurred in different cities, and one single case was reported in 2011, in the southernmost region of Brazil, due to infections related to invasive procedure. During this period, a total of 109 clinical specimens (biopsy or aspiration of abscesses fluids) from patients with signs of postsurgical, infections was sent to investigation to the Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública (IPB-LACEN/RS). The clinical specimens were processed for bacilloscopy (Ziehl-Neelsen stain) for acid-fast bacilli (AFB) and cultivated on Ogawa-Kudoh (OK) solid medium for up to four weeks at 35 - 37°C. Of the total, only 43 specimens presented growth of mycobacterial in the culture, and were further evaluated.

### *Species identification by PRA-hsp65 analysis*

DNA was extracted from colonies on OK and suspended in 250 µl of 1x Tris-EDTA (TE), boiled for 20 min, submitted to ultrasonic water bath for 15 min, and frozen at -20 °C. All 43 isolates were initially analyzed using the PCR-restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene (PRA-*hsp65*) described by Telenti *et al.* (1993) with modifications. The primers Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) and Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT) were used to generate a 441-bp fragment of the *hsp65* gene. The PCR mixture consisted of 20 ng of DNA of mycobacteria, 25 pmol of primers Tb11 and Tb12, 10X buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 10% glycerol, and 1.5 U

Go Taq® Hot Star Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI) in 50 µl of reaction. A volume of 5 µl of PCRx Enhancer System (Invitrogen™) was used to optimize the amplification reaction. Amplification was achieved with a MaxyGene Gradient Thermal Cycler, model Therm 1000 under the following conditions: 45 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, with a final extension step at 72 °C for 7 min. Amplicons were digested with *Bst*EII and *Hae*III (Promega Corporation, Madison, WI) in different reactions; restriction fragments were analyzed after 3% agarose gel (Invitrogen™) electrophoresis and staining with GelRed™. The patterns observed were compared to the reported on PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>).

#### *Species identification by DNA sequencing of the rpoB gene*

Identification of species was also performed according to the partial sequencing of the *rpoB* genes, as previously described (Adekambi *et al.*, 2003). The PCR products were purified using the polyethylene glycol method (Jolley *et al.*, 2004), and sequenced using Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences obtained were analyzed by the Chromas™, version 2.3. The sequences alignment were performed in the program DNASTAR - Lasergene 7 and the homology analysis was performed by comparison of the consensus sequence obtained from each isolate with those deposited in the GenBank using the BLAST algorithm (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### *Antimicrobial susceptibility test*

The susceptibility test to amikacin, cefoxitin, clarithromycin, ciprofloxacin, doxycycline, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tobramycin, was

performed by broth microdilution as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institutes (CLSI, 2011). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used as a quality control strain.

#### *Pulsed-field gel electrophoresis analysis*

Isolates were typed by PFGE, as described by Leão *et al.* (2010). Briefly, DNA was isolated from the plug molds, digested with *DraI* (Promega) and loaded into 1% pulsed-field certified agarose (Bio-Rad). Electrophoresis, using thiourea in the running buffer, was carried out in a CHEF-DR III system (Bio-Rad) at 14 °C for 24 h at 6 V/cm with a switch time of 1.6 to 21.3 s. Bacteriophage lambda ladder PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, MA) was used as a molecular size standard. PFGE patterns were analyzed using the BioNumerics v. 6.5 program (Applied Maths, Sint-Martens-Laten, Belgium). Dendrograms were constructed using the Dice coefficient and the unweighted pair-group method with the arithmetic averages clustering method (UPGMA), based on 2% optimization and position tolerance.

The strain CRM-0019, related to the outbreak occurred in Rio de Janeiro (RJ) from 2006 to 2007, and other five strains (CRM-0639, -0640, -0642, -0803 and -0836) from RJ unrelated to outbreaks were used in order to compare the molecular profile of our isolates.

## **Results**

One hundred nine cases of post surgical infections were reported in Rio Grande do Sul from 2007 to 2011, as follows: 34 in 2007 from Santo Ângelo city; 48 in 2008,



from Tramandaí (44) and Santa Maria (4) cities; 26 cases, in 2010, from Carazinho and one case in 2011, from Torres city (Fig. 1). Whereas only 13 (12%) clinical specimens were positive in the AFB staining, 43 (39%) revealed positive cultures in OK. All of them were identified as *M. abscessus* type 2 by PRA-*hsp65* and were further confirmed as *M. abscessus* subsp. *bolletii* according to *rpoB* gene sequencing (GenBank accession number KF360857).

The isolates were 100% susceptible to amikacin but resistant to ciprofloxacin, doxycycline, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tobramycin. Furthermore, 31 (72%) isolates were fully susceptible to ceftazidime and six 6 isolates (14%) presented fully resistance to clarithromycin (Table 1).

All 43 *M. abscessus* subsp. *bolletii* generated interpretable patterns (12 or 13 bands) by PFGE, and proved to be clonally related. In order to evaluate the relationship of this clone with the outbreaks previously described in Brazil (Duarte *et al.*, 2009), we compared the PFGE pattern of isolate CRM-0019 (from the Rio de Janeiro outbreak in 2006-2007), which belongs to the BRA100 clone, with the pattern of our isolates and they also proved to be clonally related. Although all isolates were clonally related, they did not have identical PFGE patterns; the majority of isolates (37) presented 13 bands (cluster I) but 6 isolates presented 12 bands (cluster II). The dendrogram is shown in Fig. 2.

In order to evaluate the discriminatory power of the PFGE we evaluated the patterns of five epidemiologically unrelated *M. abscessus* subsp. *bolletii* and they all proved to be distinguishable.

## Discussion

This study investigated 109 patients with post surgical infections reported in RS from 2007 to 2011 in five different cities. Only 43 specimens collected presented growth of mycobacteria in the OK medium, possibly due to the quality of the specimen collected, storage conditions and the low sensitivity of culture method for diagnosis of specimens such as biopsy and surgical wound aspirate specially during antimicrobial treatment. Communication between microbiologists and clinicians is very important to optimize the culture conditions for NTM (van Ingen, 2013). In fact, the American Thoracic Society (Griffith *et al.*, 2007) has issued diagnostic criteria in 2007 which strength the importance of the culture for NTM from sterile body sites to establish true infection by NTM.

Even with the prevention and containment adopted by the Brazilian Surveillance System, the establishment of standards, orientation procedures and discontinuation of chemical sterilization with GTA for invasive surgical equipment (ANVISA, 2011), we can observe in this study the persistence of outbreaks.

Both methods used for species identification presented identical results for all isolates. Although PRA-*hsp65* can be used as a quick and reliable method to identify NTM in the clinical laboratory (Chimara *et al.*, 2008), a more complete characterization was obtained by the sequencing of the *rpoB* gene, allowing the subspecies identification.

Interestingly, we reported 14% of resistance to clarithromycin among the isolates studied, demonstrating a different susceptibility profile compared to BRA100 clone from other Brazilian regions (Duarte *et al.*, 2009; Leao *et al.*, 2009; Monego *et al.*, 2011). This result presents a particular relevance considering that macrolide-based

regimen is frequently used for treatment of *M. abscessus* diseases (Brown-Elliott *et al.*, 2012; Griffith *et al.*, 2007). Moreover, clarithromycin is usually the option for combination therapy with amikacin (Griffith *et al.*, 2007). As the resistance to clarithromycin is usually induced (Brown-Elliott *et al.*, 2012), the increase of use of this antibiotic may have led to the emergence of RGM resistant to this antibiotic. The susceptible profile for other antibiotics was similar to those previously reported for BRA100 clone (Duarte *et al.*, 2009; Monego *et al.*, 2011).

Our results confirmed the discriminatory power of PFGE, considering that distinct molecular profiles were observed among the isolates unrelated to the outbreaks. Although all isolates were clonally related, they did not have identical PFGE patterns, resulting in two clusters with only one band (~50 kb) of difference among them. This band was investigated by another study and demonstrated the presence of IncP-1 $\beta$  circular plasmid, designated pMAB01. The detection of an IncP-1b promiscuous plasmid in *M. abscessus* subsp. *bolletii* confirmed that mycobacteria could receive and replicate genetic material from distinct phylogenetic groups of bacteria, possibly through conjugal transfer. This genetic exchange could result in the emergence of specific strains that might be better adapted to cause human disease (Leao *et al.*, 2013).

Interestingly, the 43 strains (cluster I - 13 bands and cluster II - 12 bands) presented the same profile of BRA100 clone, as previously reported in Brazilian outbreaks (Cardoso *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009; Leao *et al.*, 2010; Monego *et al.*, 2011). The spread of a single clone of *M. abscessus* subsp. *bolletii* in different regions of the country seems to be related to a common source of infection, reinforcing the concept of BRA100 clone remains as an emergent pathogen in Brazilian hospital environment (Leao *et al.*, 2010). Furthermore, recently studies indicated a molecular relationship among BRA100 clone and strains from Taiwan, Malaysia and United

Kingdom, demonstrating that this clone is worldwide disseminated (Cheng *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2013). Some aspects that possibly may explain the persistence of the BRA100 in the environment is the virulence and the biofilm formation, particularly associated to *M. abscessus* (Donlan, 2001; Duarte *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2011; Simoes *et al.*, 2005). The main factor related specifically to Brazilian outbreaks was the tolerance to GTA 2%, (Duarte *et al.*, 2009; Lorena *et al.*, 2010), although several measures have been recommended by Brazilian Surveillance System as mentioned above.

In conclusion, our study has shown the persistence of a single clone of *M. abscessus* subsp. *bolletii* BRA100 responsible for outbreaks in distinct periods from 2007 to 2011 in RS state. It is important to note that this is the first report of clarithromycin resistance among isolates belonging to BRA100, which indicates an important change in the susceptibility profile of this clone. *M. abscessus* subsp. *bolletii* BRA100 have been persisting even with the control measures adopted by the Brazilian Public Health Surveillance System, indicating that these actions solely are not being effective to avoid the dissemination or they are not being rigorously implemented by health institutions. Therefore, our study contributes for the knowledge of the epidemiologic profile and the magnitude of infections due to BRA100 in our country.

### **Acknowledgments**

This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq; Edital Universal, process n°. 480789/2010-0 MCT/CNPq 14/2010), ICOHRTA 5 U2R TW006883-02 and ENSP-011-LIV-10-2-3. The authors would like to thank the staff from the Seção de

Micobactérias from IPB/LACEN–FEPPS, Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia - UFRJ for helping with processing the samples and culture management and Marilina Bercini of Divisão de Vigilância Epidemiológica and Ana Luiza Rammé of Divisão de Vigilância Sanitária, Centro Estadual de Vigilância em Saúde/RS.

## References

- Adekambi, T., Colson, P. & Drancourt, M. (2003).** *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **41**, 5699-5708.
- ANVISA (2011).** Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde - GGTES.
- Brown-Elliott, B. A., Nash, K. A. & Wallace, R. J., Jr. (2012).** Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiol Rev* **25**, 545-582.
- Cardoso, A. M., Martins de Sousa, E., Viana-Niero, C., Bonfim de Bortoli, F., Pereira das Neves, Z. C., Leão, S. C., Junqueira-Kipnis, A. P. & Kipnis, A. (2008).** Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes Infect* **10**, 1552-1557.
- Cheng, A., Liu, Y. C., Chen, M. L., Hung, C. C., Tsai, Y. T., Sheng, W. H., Liao, C. H., Hsueh, P. R., Chen, Y. C. & other authors (2013).** Extrapulmonary infections caused by a dominant strain of *Mycobacterium massiliense* (*Mycobacterium abscessus* subsp *bolletii*). *Clin Microbiol Infect* **19**, E473-482.
- Chimara, E., Ferrazoli, L., Ueky, S. Y., Martins, M. C., Durham, A. M., Arbeit, R. D. & Leao, S. C. (2008).** Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC microbiology* **8**, 48.
- Chu, H. S. & Hu, F. R. (2013).** Non-tuberculous mycobacterial keratitis. *Clin Microbiol Infect* **19**, 221-226.

- CLSI (2011).** Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. In *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 2nd edn edn, vol. 31. Wayne, PA.
- Davidson, R. M., Hasan, N. A., de Moura, V. C., Duarte, R. S., Jackson, M. & Strong, M. (2013).** Phylogenomics of Brazilian epidemic isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* reveals relationships of global outbreak strains. *Infect Genet Evol* **20**, 292-297.
- Donlan, R. M. (2001).** Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infect Dis* **33**, 1387-1392.
- Duarte, R. S., Lourenço, M. C., Fonseca, L. e. S., Leão, S. C., Amorim, E. e. L., Rocha, I. L., Coelho, F. S., Viana-Niero, C., Gomes, K. M. & other authors (2009).** Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* **47**, 2149-2155.
- Euzéby, J. P. (2014).** LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterionet/-newshtml>.
- Falkinham, J. O., 3rd (2013).** Ecology of nontuberculous mycobacteria-where do human infections come from? *Semin Respir Crit Care Med* **34**, 95-102.
- Griffith, D. E., Aksmit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G. & other authors (2007).** An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 367-416.
- Ivan, M., Dancer, C., Koehler, A. P., Hobby, M. & Lease, C. (2013).** *Mycobacterium chelonae* abscesses associated with biomesotherapy, Australia, 2008. *Emerg Infect Dis* **19**.

- Jolley, K. A., Chan, M. S. & Maiden, M. C. (2004).** mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC bioinformatics* **5**, 86.
- Kasperbauer, S. & Huitt, G. (2013).** Management of extrapulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* **34**, 143-150.
- Kim, H. Y., Kook, Y., Yun, Y. J., Park, C. G., Lee, N. Y., Shim, T. S., Kim, B. J. & Kook, Y. H. (2008).** Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group isolates. *J Clin Microbiol* **46**, 3384-3390.
- Koh, W. J., Jeon, K., Lee, N. Y., Kim, B. J., Kook, Y. H., Lee, S. H., Park, Y. K., Kim, C. K., Shin, S. J. & other authors (2011).** Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 405-410.
- Kothavade, R. J., Dhurat, R. S., Mishra, S. N. & Kothavade, U. R. (2013).** Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**, 161-188.
- Leao, S. C., Tortoli, E., Viana-Niero, C., Ueki, S. Y., Lima, K. V., Lopes, M. L., Yubero, J., Menendez, M. C. & Garcia, M. J. (2009).** Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* group is needed. *J Clin Microbiol* **47**, 2691-2698.
- Leao, S. C., Matsumoto, C. K., Carneiro, A., Ramos, R. T., Nogueira, C. L., Lima, J. D., Jr., Lima, K. V., Lopes, M. L., Schneider, H. & other authors (2013).** The detection and sequencing of a broad-host-range conjugative IncP-1beta plasmid in an epidemic strain of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. *PLoS One* **8**, e60746.



- Leao, S. C., Viana-Niero, C., Matsumoto, C. K., Lima, K. V., Lopes, M. L., Palaci, M., Hadad, D. J., Vinhas, S., Duarte, R. S. & other authors (2010).** Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. *Future Microbiol* **5**, 971-980.
- Lorena, N. S., Pitombo, M. B., Côrtes, P. B., Maya, M. C., Silva, M. G., Carvalho, A. C., Coelho, F. S., Miyazaki, N. H., Marques, E. A. & other authors (2010).** Mycobacterium massiliense BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. *Acta Cir Bras* **25**, 455-459.
- Monego, F., Duarte, R. S., Nakatani, S. M., Araújo, W. N., Riediger, I. N., Brockelt, S., Souza, V., Cataldo, J. I., Dias, R. C. & other authors (2011).** Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. *Braz J Infect Dis* **15**, 436-441.
- Piersimoni, C. & Scarparo, C. (2009).** Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis* **15**, 1351-1358.
- Redelman-Sidi, G. & Sepkowitz, K. A. (2010).** Rapidly growing mycobacteria infection in patients with cancer. *Clinical Infect Dis* **51**, 422-434.
- Sampaio, J. L. (2010).** Prokaryotic taxonomy rules and nomenclature changes in the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group. *Future Microbiol* **5**, 1457; author reply 1459.
- Shang, S., Gibbs, S., Henao-Tamayo, M., Shanley, C. A., McDonnell, G., Duarte, R. S., Ordway, D. J. & Jackson, M. (2011).** Increased virulence of an epidemic strain of *Mycobacterium massiliense* in mice. *PLoS One* **6**, e24726.

- Simoës, M., Pereira, M. O. & Vieira, M. J. (2005).** Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Research* **39**, 5142-5152.
- Song, J. Y., Son, J. B., Lee, M. K., Gwack, J., Lee, K. S. & Park, J. Y. (2012).** Case series of *Mycobacterium abscessus* infections associated with a trigger point injection and epidural block at a rural clinic. *Epidemiol and Health* **34**, e2012001.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C. & Bodmer, T. (1993).** Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**, 175-178.
- Tortoli, E. (2009).** Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect* **15**, 906-910.
- van Ingen, J. (2013).** Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* **34**, 103-109.
- van Ingen, J., Boeree, M. J., Dekhuijzen, P. N. & van Soolingen, D. (2009).** Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clin Microbiol Infect* **15**, 888-893.
- Viana-Niero, C., Lima, K. V., Lopes, M. L., Rabello, M. C., Marsola, L. R., Brilhante, V. C., Durham, A. M. & Leão, S. C. (2008).** Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J Clin Microbiol* **46**, 850-855.

Table 1: Susceptibility profile of 43 *M. abscessus* subsp. *bolletii*

Drug	Resistant n (%)	Intermediate n (%)	Susceptible n (%)
AMK	0	0	43 (100)
FOX	0	12 (28)	31 (72)
CLR	6 (14)	0	37 (86)
CIP	43 (100)	0	0
DOX	43 (100)	0	0
SXT	43 (100)	0	0
MXF	43 (100)	0	0
TOB	43 (100)	0	0

AMK, Amikacin; FOX, Cefoxitin; CLR, Clarithromycin; CIP, Ciprofloxacin; DOX, Doxycycline; SXT, Trimethoprim-Sulfamethoxazole; MXF, Moxifloxacin; TOB, Tobramycin.

Minimum inhibitory concentration breakpoints according to CLSI (2011).

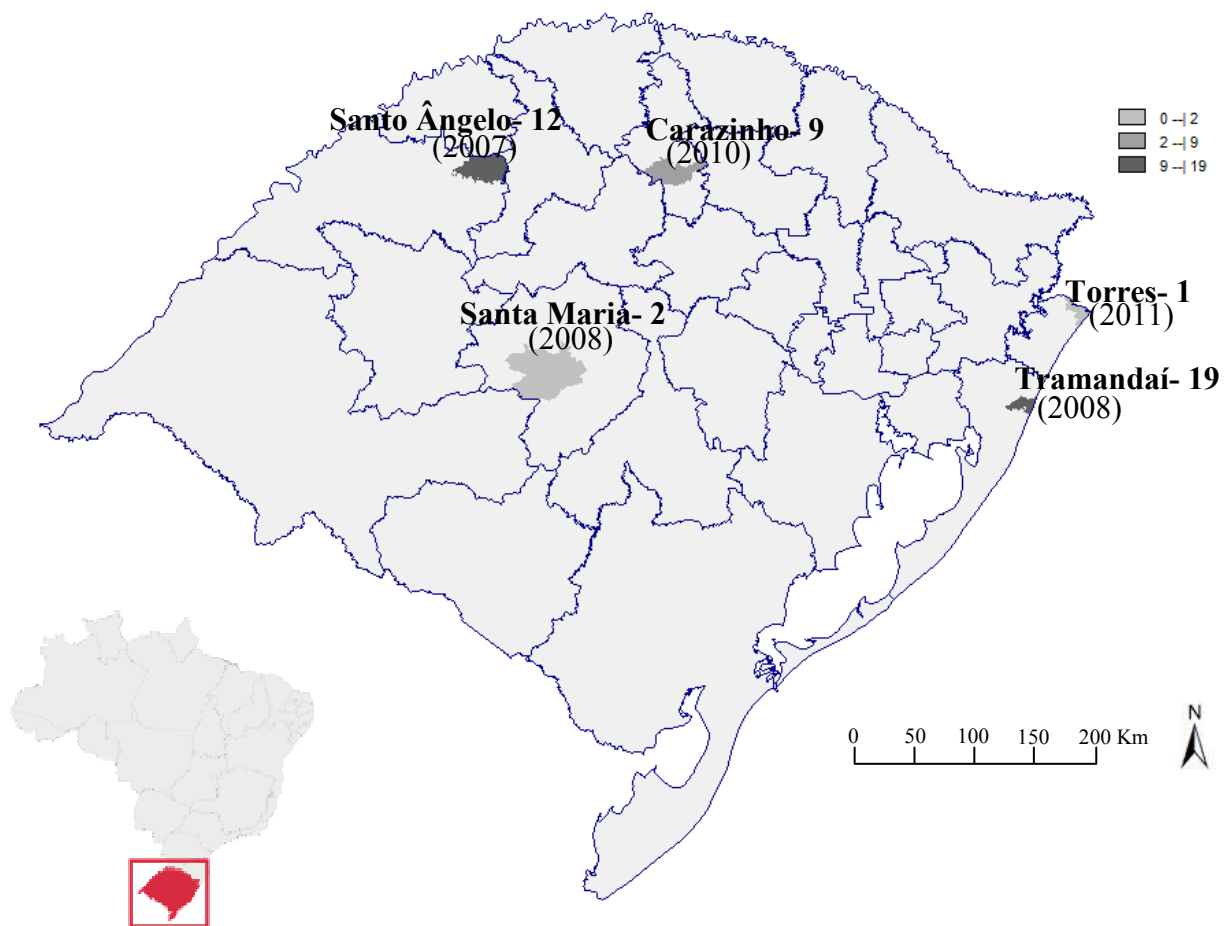


Figure 1: Confirmed cases of *M. abscessus* subsp. *bolletii* from postsurgical infections in Rio Grande do Sul state from 2007 to 2011.

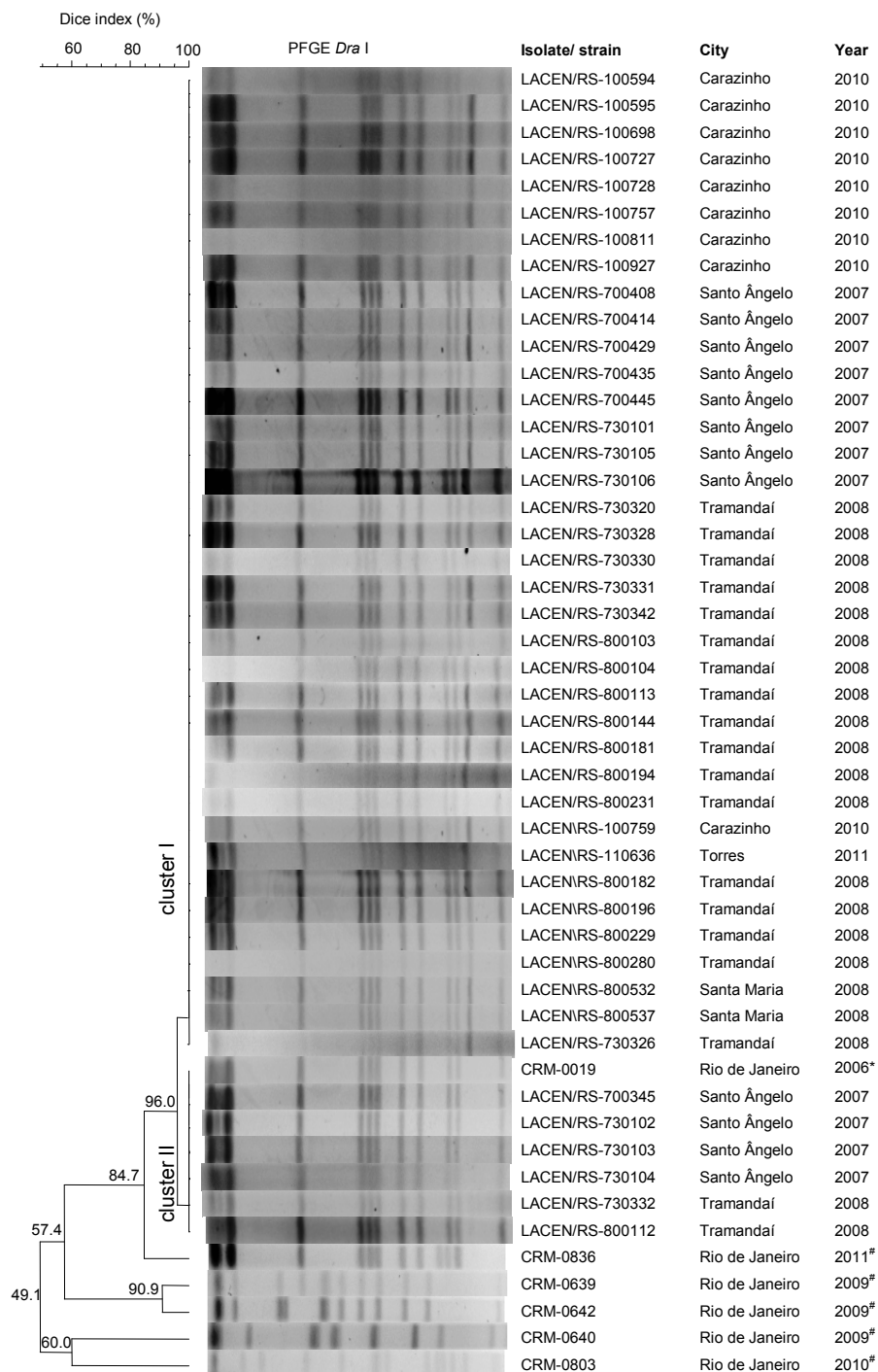


Figure 2: Dendrogram of *Dra*I PFGE patterns of isolates from 43 patients related to outbreaks, 5 isolates unrelated to outbreaks (CRM-0639<sup>#</sup>, -0640<sup>#</sup>, -0642<sup>#</sup>, -0803<sup>#</sup> and -0836<sup>#</sup>) and CRM-0019\*. Dendrogram were prepared using the BioNumerics (version 6.5) program by the Dice unweighted-pair group method with arithmetic means, based on 2% optimization and position tolerance.

**5.2 MANUSCRITO II - Mutations in *gyrA* and *gyrB* genes confer quinolone resistance in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus* complex**

**Mutations in *gyrA* and *gyrB* genes confer quinolone resistance in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus* complex**

**Running title: Quinolone resistance in *gyrA* and *gyrB* mutation to RGM**

Luciana de Souza Nunes<sup>1,2</sup>, Ludmila Fiorenzano Baethgen<sup>3</sup>, Maiara Carneiro<sup>4</sup>, Roberta Flôres Silva<sup>5</sup>, Marta Osório Ribeiro<sup>3</sup>, Simone Maria Martini de David<sup>3</sup>, Rafael Silva Duarte<sup>6</sup>, Afonso Luís Barth<sup>1,2,4,#</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup> Laboratório Central de Saúde Pública, Porto Alegre, Brazil; <sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; <sup>5</sup> Faculdade de Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; <sup>6</sup> Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil;

# Corresponding Author: Afonso Luis Barth

Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, Porto Alegre, Brazil, 2350 Ramiro Barcelos St, 90035-903. Porto Alegre, Brazil.

Phone/fax: +55 (51) 33598607. E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

## Summary

Resistance of *Mycobacterium* spp to quinolones has predominantly been attributed to mutations in *gyrA* and *gyrB* genes. The aim of this study was to investigate possible mutations in *gyrA* and *gyrB* genes among isolates of rapid growing mycobacterium (RGM) and their relationship with the susceptibility profile against ciprofloxacin and moxifloxacin. A total of 74 isolates were obtained in the period of 2007 to 2012, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The isolates were identified by *ropB* gene sequencing as follows: 43 isolates were identified as *M. abscessus* subsp. *bolletii*, 21 isolates as *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, and ten isolates as *M. abscessus* subsp. *abscessus*. The susceptibility profile against ciprofloxacin and other antibiotics was assessed by broth microdilution according to CLSI (2011). All isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii* were resistant whereas all isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* were susceptible to ciprofloxacin. Among *M. abscessus* subsp. *abscessus* 70% were resistant and 30% were classified as intermediate to the quinolone. All isolates of the *M. abscessus* subsp. *bolletii* and *M. abscessus* subsp. *abscessus* and ten isolates of the *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* were resistant to moxifloxacin. All RGM, regardless the species, resistant (or intermediate) to ciprofloxacin and moxifloxacin presented a Alanine at position 83 (Ala-83) when GyrA peptide sequence was analyzed, in contrast to a Serine (Ser-83) which was found in all susceptible isolates. No difference was found in the GyrB peptide regardless the susceptibility profile of RGM. In conclusion, our results showed that for *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* the Ser-83 in the peptide GyrA is not enough to confer quinolone resistance. On the other hand, mutations at amino acid Ala-83 of GyrA are directly related to resistance to ciprofloxacin in *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

Keywords: quinolone resistance; *gyrA*; *gyrB*; *Mycobacterium*



## Introduction

Quinolones have been used in combination with other anti-mycobacterial agents. Newer potential oral agents being considered for use in combination with clarithromycin include the 8- methoxyfluoroquinolones (gatifloxacin and moxifloxacin) (Rodriguez Diaz *et al.*, 2003). However, their role in the treatment of *M. abscessus* infections remains to be determined. The regimen of clarithromycin and moxifloxacin is associated with a more rapid resolution of cutaneous lesions caused by *M. abscessus* compared to the combination of clarithromycin and amikacin (Choi *et al.*, 2011). This fastest therapy action is important as the *M. abscessus* is considered the most virulent (Shang *et al.*, 2011) and chemotherapy-resistant member of the rapidly growing mycobacterium (RGM) group (Petrini, 2006). On the other hand, the treatment for *M. fortuitum* has been much easier and generally more effective due to this group presents a more susceptible profile (Griffith *et al.*, 2007).

The usual therapeutic drugs recommended for RGM include ciprofloxacin, doxycycline, clarithromycin-azithromycin, linezolid, moxifloxacin, (oral); amikacin, cefoxitin, imipenem, linezolid, tigecycline, (parenteral) (Brown-Elliott *et al.*, 2012). The multidrug treatment regimens are frequently associated with medication related adverse events, including toxicities, side effects, and allergic reactions (Griffith *et al.*, 2007). Due to the higher toxicity of parenteral drugs, oral agents should be considered for use in combination with clarithromycin, providing effective treatment and increasing patient adherence. Choi *et al.*, (2010) showed that the combination regimen of clarithromycin and moxifloxacin resulted in a better clinical response than a regimen of clarithromycin plus amikacin when used for treatment of cutaneous *M. abscessus* infection and the only common adverse event was gastrointestinal discomfort.

Conserved regions in the DNA gyrase subunits A and B, referred as quinolone-resistance-determining regions (QRDR GyrA and GyrB), have been suggested to be involved in quinolone resistance (Drlica & Zhao, 1997). The increasing use of fluoroquinolones (FQs) in mycobacterial infections has led to emergence of FQ-resistant isolates, due to the development of defense mechanisms (Champoux, 2001). The site of interaction is likely the QRDRs, classically domains 67 to 106 in GyrA and 426 to 464 in GyrB, where the majority of mutations conferring quinolone resistance are found (Takiff *et al.*, 1994).

Mutations in *gyrA* gene, mainly found the presence of an alanine at position 83 and 87, results in a modified in GyrA QRDR, responsible for ensuring high level of resistance to quinolones in the *Mycobacterium* genus (Cheng *et al.*, 2004; Guillemin *et al.*, 1995). The amino acids arginine and asparagine at positions 447 and 464 of the QRDR of GyrB, respectively, seem to be also involved in the low level of resistance to quinolones (Guillemin *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2005).

FQ have been increasingly used for the effective treatment of infections caused by RGM, however, there are concerns that mutations in the QRDRs compromise the efficacy of the treatment. Therefore, antimicrobial susceptibility reports and mutations associated can be used to support the appropriate regimens for the treatment of RGM. Due to this, the aim of this study was to evaluate the susceptibility and investigate mutations in *gyrA* and *gyrB* gene in 74 isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* from Southern Brazil. This of the first work that performed the molecular characterization of RGM in the state of Rio Grande do Sul.

## Methods

### *Bacterial isolates*

A total of 74 isolates of RGM were referred the Mycobacteria reference center (“Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública - IPB-LACEN/RS”) in Rio Grande do Sul state, Southern Brazil during the period of 2007 to 2012. Samples were collected from biopsy, aspiration of abscess fluids, sputum and bronchial lavage and were cultivated on Ogawa-Kudoh (OK) solid medium for up to 4 weeks at 37 °C ( $\pm 1$  °C). This study was approved by the Ethics Committee of “Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre” (reference number 09-0653).

### *Species Identification*

The identification of isolates was based on partial sequencing of the *rpoB* genes, as previously described (Adekambi *et al.*, 2003). DNA was extracted from colonies on OK and suspended in 250  $\mu$ l of 1x Tris-EDTA (TE), boiled for 20 min, submitted to ultrasonic water bath for 15 min, and frozen at - 20°C. DNA amplification and sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products were performed with primers MycoF (5'-GCAAGGTCACCCCGAAGGG) and MycoR (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC) resulting in a 764-bp fragment. The PCR products were purified using the polyethylene glycol method (Jolley *et al.*, 2004) and sequenced using Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Alignment of the sequences was performed in the program DNASTAR - Lasergene 7, the homology analysis was performed by comparison of the consensus sequence obtained from each isolate with those

deposited in the GenBank using the BLAST algorithm (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### *Broth microdilution*

The susceptibility profile was evaluated by broth microdilution against amikacin, cefoxitin, clarithromycin, ciprofloxacin, doxycycline, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tobramycin, as recommended by CLSI (CLSI, 2011). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used as a quality control strain. The susceptibility patterns were interpreted according to the MIC breakpoints defined by CLSI (2011) for RGM.

#### *PCR for the gyrA and gyrB genes*

For all isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* the DNA was obtained from colonies on OK medium. The colonies were resuspended in 250 µl of 1x Tris-EDTA (TE), boiled for 20 min, submitted to ultrasonic water bath for 15 min, and frozen at - 20°C. PCR amplification of *gyrA* and *gyrB* was performed as previously described (Guillemin *et al.*, 1995; Guillemin *et al.*, 1998), using the degenerated oligonucleotides Pri9 (5'-CGCCGCGTGCTSATGCRATG-3') and Pri8 (5'-YGGTGGRTCRTRCCYGGCGA-3') for *gyrA* gene and using GyrbD (5'-CCGAYTGCCGTTCSACGGAT-3') and GyrbE (5'-CGGCCATCARCACGATCTTG-3') for *gyrB* gene. The PCR mixture consisted of 20 ng of DNA of mycobacteria, 25 pmol of each primer, 10X buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 10% glycerol, and 1.5 U Go Taq® Hot Star Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI) in 50 µl of reaction. After 10 min of

denaturation at 94 °C, 40 amplification cycles were performed, as follows: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. A final extension step was performed for 10 min at 72 °C. The sizes of the amplicons of *gyrA* and *gyrB* genes were 216 and 268 bp, respectively.

#### *Sequencing gyrA and gyrB amplicons*

The amplicons were purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Samples were sequenced using ABI 3500 Genetic Analyzer with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied Biosystems). PCR products were labeled with 3.2 pmol of the primer and 1 µL of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final volume of 10 µL. Labeling reactions were performed in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96°C for 1 min followed by 35 cycles of 96°C for 15 sec, 50°C for 15 sec and 60°C for 4 min. Labeled samples were purified using BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) and electroinjected in the automatic sequencer.

#### *Sequence analysis*

The sequences obtained were analysed with program DNASTAR - Lasergene 7 and compared with those deposited in the GenBank database by using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). *M. tuberculosis* strain ATCC 25618 (H37Rv) was included as reference for sequence alignment.

## Results

The *rpoB* gene sequence identified 74 isolates in the period 2007 to 2012. Ten isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 43 isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii* and 21 isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*.

The genotypic association was analyzed by PFGE, these isolates showed different profiles to *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* and *M. abscessus* subsp. *abscessus* in different patients, to *M. abscessus* subsp. *bolletii* had the single clone BRA100 (data not shown).

### *Susceptibility testing*

All isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii* were resistant to ciprofloxacin. Seven of the ten isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus* were resistant to ciprofloxacin and the other three isolates presented intermediate-resistance. All isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* were susceptible to ciprofloxacin. For moxifloxacin all isolates of the *M. abscessus* subsp. *bolletii* and *M. abscessus* subsp. *abscessus* were resistant. For *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* 10 isolates were resistant and 11 isolates susceptible. For clarithromycin all isolates of the *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* and six isolates (14%) of the *M. abscessus* subsp. *bolletii* were resistant. All isolates were resistant to doxycycline and trimethoprim-sulfamethoxazole and were susceptible to amikacin (Table 1).

### *Nucleotide sequences of the gyrA and gyrB QRDRs*

The nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *M. abscessus* subsp. *bolletii* and *M. abscessus* subsp. *abscessus* differed in only one nucleotide with an exchange of a C-T at position 252 and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* there were 14 divergent positions when

compared with *M. tuberculosis* (numbering system used for *M. tuberculosis* ATCC 25618) (Fig. 1). The *M. abscessus* subsp. *bolletii* isolates showed 100% homology to the *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 594 (GU143881) strain, the *M. abscessus* showed 100% homology to the *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 (X87117) strain and the *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* showed 99% homology to the *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 (HQ324099) strain.

The nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *M. abscessus* subsp. *bolletii* showed three different patterns and the sequences of *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* showed two different patterns (Fig. 1). For *M. abscessus* subsp. *bolletii* in pattern 1 consisting of 36 isolates showed 100% homology to the *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 594 (GU143881) strain, in pattern 2 consisting of 5 isolates showed 99% homology to the INCQS 594 (GU143881) strain, in pattern 3 consisting of 1 isolates showed 100% homology to the *M. abscessus* subsp. *bolletii* CCUG 48898 (GU143885) strain. For *M. abscessus* subsp. *abscessus* in pattern 1 consisting of 3 isolates showed 99% homology to the *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 (HQ324102) strain, in pattern 2 consisting of 7 isolates showed 100% homology to the ATCC 19977 strain. For *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* in pattern 1 consisting of one isolates showed 98% homology to the *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 (AJ564405) strain, in pattern 2 consisting of 20 isolates showed 100% homology to the *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 (HQ324099) strain.

#### *Peptide sequences of the GyrA and GyrB QRDRs*

Peptide sequences of GyrA and GyrB were used according to the number system of *E. coli*, the GyrA QRDR extends from amino acid residues 67 to 106, and the GyrB QRDR extends from amino acid residues 436 to 464. In QRDR GyrA all ciprofloxacin-resistant (49)

and intermediate (3) isolates presented the presence of Alanine at position 83 (Ala-83), the same residues as found in strains of *M. tuberculosis* (de Moura *et al.*, 2012). On the other hand, the ciprofloxacin-susceptible *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* presented a Serine at position 83 (Ser-83) in GyrA peptide sequences (Fig. 2), the same residues as found in *S. aureus* (Ito *et al.*, 1994) and *S. pneumoniae* (Pan *et al.*, 1996).

For all isolates the peptide sequence were identical for GyrB QRDR which showed the presence of arginine and asparagine at positions 436, 447 and 464 (Arg-436, Arg-447 and Asn-464), the same residues as found in strains of *M. tuberculosis* (Fig. 2).

## Discussion

Infections due to the *M. abscessus* group are difficult to treat because these mycobacteria are intrinsically resistant not only to the classical anti-tuberculous drugs, but also to the most active antibiotics currently available (Brown-Elliott & Wallace, 2002; Brown-Elliott *et al.*, 2012; Chopra *et al.*, 2011). As expected, amikacin proved to be the more active drug in vitro, followed by cefoxitin, whereas for clarithromycin a variable profile was observed, which appears to be specie-related. Our results demonstrated high (>85%) rates of resistance to doxycycline, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tobramycin for the three species of nontuberculous mycobacteria (NTM) tested.

Treatment regimens are based on susceptibility to macrolide, aminoglycoside, quinolones, imipenem, tetracycline, cefoxitin, co-trimoxazole, or linezolid (Griffith *et al.*, 2007), hence, these drugs are candidates for in vitro for drug susceptibility testing (van Ingen *et al.*, 2012). According to our study, high antimicrobial resistance rates were observed, despite the fact that they were used as treatment of choice for RGM infections, these results indicate that the susceptibility has to be evaluated in vitro for all RGM (or NTM).



A very distinct susceptibility profile was observed against ciprofloxacin among the species: whereas seven isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus* and all isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii* were resistant, three isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus* were intermediate and all isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* were susceptible.

Moreover, all resistant isolates to ciprofloxacin proved to present alterations in the nucleotide sequence of *gyrA* gene, with substitution of a Serine by an Alanine at position 83 (Ala-83). Previous studies including these and other *Mycobacterium* species have already shown the relation between resistance to quinolones and these amino acids in position 83 (de Moura *et al.*, 2012; Guillemain *et al.*, 1995; Monego *et al.*, 2012). As quinolones act on the gyrase-DNA binary complex, a weak stability of this complex could explain, at least in part, the reduction in the susceptibility to quinolones due to the weak stability of the ternary complex that involves the antibiotic structure (Matrat *et al.*, 2008). Conversely, all isolates which presented the amino acid Serine at the same position (Ser-83) proved to be susceptible, possibly due to a more stable conformation of the whole structure. Similar results were found by Matrat *et al.*, (2008), for *E. coli*, *S. enterica* and *H. influenzae* species and by Moura *et al.*, (2012) for 14 species of NTM, confirming that Ser-83 in the peptide sequence of GyrA confers quinolone susceptibility. It is of note that both quinolones tested in this study presented different susceptibility profile for *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*.

The latest CLSI document (CLSI, 2011) also features breakpoint concentrations for linezolid and moxifloxacin, although the clinical role of these compounds has not been established. This study to moxifloxacin only 11 isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* showed sensitivity profile, with 85% of resistance for isolates (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*). According to Sirgel *et al.* (2012) despite the presence of *gyrA* mutations, moxifloxacin significantly impedes bacterial growth, supporting its use for the treatment.

Amino acids 436 and 447 of GyrB are part of the “quinolone binding pocket,” along with DNA and the QRDR of GyrA (Hedde & Maxwell, 2002). The GyrB QRDR may also be involved in quinolone trapping, since the mutated enzyme with R447K in GyrB cannot cleave DNA in the presence of quinolones (Matrat *et al.*, 2008). It was shown that the presence of arginine and asparagine at positions 447 and 464 (Arg-447 and Asn-464), respectively, within GyrB QRDR confer resistance to fluoroquinolones in *M. abscessus*, as well as in *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum* and *M. chelonae* (Matrat *et al.*, 2008; Nessar *et al.*, 2012).

Interestingly, the isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* with Ser-83 in GyrA plus Arg-447 and Asn-464 in GyrB, presented a variable profile of susceptibility for moxifloxacin. In contrast, all isolates of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* proved to be susceptible to ciprofloxacin. Therefore, it seems that these mutations (Ser-83 in GyrA plus Arg-447 and Asn-464 in GyrB) were not sufficient to confer resistance to moxifloxacin. This confirms the fact that quinolones interact differently with QRDR structure (Matrat *et al.*, 2008).

In conclusion, our results showed that the presence of a Ala-83 in the peptide GyrA plus an Arg-447 and Asn-464 in the peptide GyrB are frequent and are an important mechanism of resistance to FQ in *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*. On the other hand, for *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* the Ser-83 in the peptide GyrA plus an Arg-447 and Asn-464 in the peptide GyrB are not enough to confer FQ resistance.

## **Acknowledgements**

This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq; Edital Universal, process n°. 480789/2010-0 MCT/CNPq 14/2010), ICOHRTA 5 U2R TW006883-02 and ENSP-011-LIV-10-2-3. The authors would like to thank the staff from the Seção de Micobactérias from

IPB/LACEN–FEPPS, Laboratório de Micobactérias for helping with processing the samples and culture management.

## References

- Adekambi, T., Colson, P. & Drancourt, M. (2003).** *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **41**, 5699-5708.
- Brown-Elliott, B. A. & Wallace, R. J., Jr. (2002).** Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiol Rev* **15**, 716-746.
- Brown-Elliott, B. A., Nash, K. A. & Wallace, R. J., Jr. (2012).** Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiol Rev* **25**, 545-582.
- Champoux, J. J. (2001).** DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Rev of Biochem* **70**, 369-413.
- Cheng, A. F., Yew, W. W., Chan, E. W., Chin, M. L., Hui, M. M. & Chan, R. C. (2004).** Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents and Chemother* **48**, 596-601.
- Choi, W. S., Kim, M. J., Park, D. W., Son, S. W., Yoon, Y. K., Song, T., Bae, S. M., Sohn, J. W., Cheong, H. J. & other authors (2011).** Clarithromycin and amikacin vs. clarithromycin and moxifloxacin for the treatment of post-acupuncture cutaneous infections due to *Mycobacterium abscessus*: a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1084-1090.
- Chopra, S., Matsuyama, K., Hutson, C. & Madrid, P. (2011).** Identification of antimicrobial activity among FDA-approved drugs for combating *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J of Antimicrob Chemother* **66**, 1533-1536.

- CLSI (2011).** Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. In *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 2nd edn edn, vol. 31. Wayne, PA.
- de Moura, V. C., da Silva, M. G., Gomes, K. M., Coelho, F. S., Sampaio, J. L., Mello, F. C., Lourenço, M. C., Amorim, E. e. L. & Duarte, R. S. (2012).** Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* recovered from postsurgical infections. *J Med Microbiol* **61**, 115-125.
- Drlica, K. & Zhao, X. (1997).** DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 377-392.
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G. & other authors (2007).** An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 367-416.
- Guillemin, I., Cambau, E. & Jarlier, V. (1995).** Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. *Antimicrob Agents and Chemother* **39**, 2145-2149.
- Guillemin, I., Jarlier, V. & Cambau, E. (1998).** Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. *Antimicrob Agents and Chemother* **42**, 2084-2088.
- Hedde, J. & Maxwell, A. (2002).** Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob Agents and Chemother* **46**, 1805-1815.
- Huang, T. S., Kunin, C. M., Shin-Jung Lee, S., Chen, Y. S., Tu, H. Z. & Liu, Y. C. (2005).** Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre: 1995-2003. *J of Antimicrob Chemother* **56**, 1058-1062.

- Ito, H., Yoshida, H., Bogaki-Shonai, M., Niga, T., Hattori, H. & Nakamura, S. (1994).** Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother* **38**, 2014-2023.
- Jolley, K. A., Chan, M. S. & Maiden, M. C. (2004).** mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **5**, 86.
- Matrat, S., Aubry, A., Mayer, C., Jarlier, V. & Cambau, E. (2008).** 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. *Antimicrob Agents and Chemother* **52**, 2909-2914.
- Monego, F., Duarte, R. S. & Biondo, A. W. (2012).** *gyrA* and *gyrB* gene mutation in ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium massiliense* clinical isolates from Southern Brazil. *Microb Drug Resist* **18**, 1-6.
- Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J. M., Murray, A. & Gicquel, B. (2012).** *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J of Antimicrob Chemother* **67**, 810-818.
- Pan, X. S., Ambler, J., Mehtar, S. & Fisher, L. M. (1996).** Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother* **40**, 2321-2326.
- Petrini, B. (2006).** *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **114**, 319-328.
- Rodriguez Diaz, J. C., Lopez, M., Ruiz, M. & Royo, G. (2003).** In vitro activity of new fluoroquinolones and linezolid against non-tuberculous mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **21**, 585-588.

- Shang, S., Gibbs, S., Henao-Tamayo, M., Shanley, C. A., McDonnell, G., Duarte, R. S., Ordway, D. J. & Jackson, M. (2011).** Increased virulence of an epidemic strain of *Mycobacterium massiliense* in mice. *PLoS One* **6**, e24726.
- Takiff, H. E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W. M., Kreiswirth, B., Cole, S. T., Jacobs, W. R., Jr. & Telenti, A. (1994).** Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents and Chemother* **38**, 773-780.
- van Ingen, J., Boeree, M. J., van Soolingen, D. & Mouton, J. W. (2012).** Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resistance Updates* **15**, 149-161.

Table 1: Antibiotic resistance rates in *M. abscessus* subsp. *abscessus* ( $n = 10$ ), *M. abscessus* subsp. *bolletii* ( $n = 43$ ) and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ( $n = 21$ )

Antimicrobial agent	Susceptibility profile of <i>Mycobacterium</i> strains								
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>			<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>		
	S (%) <sup>*</sup>	I (%) <sup>*</sup>	R (%) <sup>*</sup>	S (%) <sup>*</sup>	I (%) <sup>*</sup>	R (%) <sup>*</sup>	S (%) <sup>*</sup>	I (%) <sup>*</sup>	R (%) <sup>*</sup>
<b>AMK</b>	10 (100)	0	0	43 (100)	0	0	21 (100)	0	0
<b>FOX</b>	0	10 (100)	0	12 (28)	31 (72)	0	21 (100)	0	0
<b>CLR</b>	0	0	10 (100)	37 (86)	0	6 (14)	0	0	21 (100)
<b>CIP</b>	0	3 (30)	7 (70)	0	0	43 (100)	21 (100)	0	0
<b>DOX</b>	0	0	10 (100)	0	0	43 (100)	0	0	21 (100)
<b>SXT</b>	0	0	10 (100)	0	0	43 (100)	0	0	21 (100)
<b>MXF</b>	0	0	10 (100)	0	0	43 (100)	11 (52,4)	0	10 (47,6)
<b>TOB</b>	2 (20)	2 (20)	6 (60)	0	0	43 (100)	0	6 (29)	15 (71)
<b>Amino acid in GyrA</b>	Ala-83			Ala-83			Ser-83		
<b>Amino acid in GyrB</b>	Arg-447; Asn-464			Arg-447; Asn-464			Arg-447; Asn-464		

\* Minimum inhibitory concentration breakpoints adapted from CLSI (2011) for resistant (R), intermediate (I) and susceptible (S) were as follows: AMK (Amikacin),  $R \geq 64 \mu\text{g/ml}$ ,  $I = 32 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 16 \mu\text{g/ml}$ ; FOX (Cefoxitin),  $R \geq 128 \mu\text{g/ml}$ ,  $I = 32-64 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 16 \mu\text{g/ml}$ ; CLR (Chlaritromycin),  $R \geq 8 \mu\text{g/ml}$ ,  $I = 4 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 2 \mu\text{g/ml}$ ; CIP (Ciprofloxacin),  $R \geq 4 \mu\text{g/ml}$ ,  $I = 2 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ; DOX (Doxycycline),  $R \geq 8 \mu\text{g/ml}$ ,  $I = 2-4 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ; SXT (Trimethoprim-Sulfamethoxazole),  $R \geq 76 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 38 \mu\text{g/ml}$ ; MXF (Moxifloxacin),  $R \geq 4 \mu\text{g/ml}$ ,  $I = 2 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ; TOB (Tobramycin),  $R \geq 8 \mu\text{g/ml}$ ,  $I = 4 \mu\text{g/ml}$ ,  $S \leq 2 \mu\text{g/ml}$ .



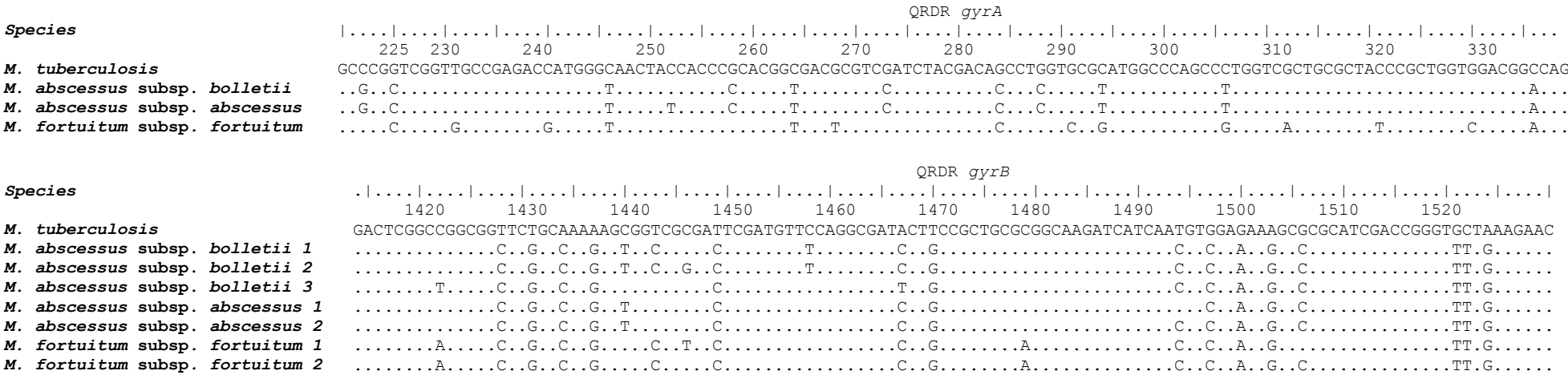


Figure 1: Comparison between nucleotide sequence of the QRDRs of *gyrA* and *gyrB* from *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*. Sequence of *M. tuberculosis* were used as the reference and dots represent identical nucleotides and in the numbering system. Sequences extend from nucleotides 220 to 339 for *gyrA* and from nucleotides 1414 to 1530 for *gyrB*.

<i>Species</i>	QRDR GyrA				Phenotype for CIP* (n) = 74	Phenotype for MXF* (n) = 74
	70	80	90	100		
<i>M. tuberculosis</i>	AR	SVAETMGNYHPHGDA	SIYDSLVRMAQPW	SLRYPLVDGQ		
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	.....	A.....	T.....	.....	R (43)	R (43)
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	.....	A.....	T.....	.....	I (3)/R (7)	R (10)
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	.....	S.....	T.....	.....	S (21)	S (11)/R (10)

<i>Species</i>	QRDR GyrB				Phenotype for CIP* (n) = 74	Phenotype for MXF* (n) = 74
	430	440	450	460		
<i>M. tuberculosis</i>	DSAGGSAKSGRDSMFQAILPLR	LGKIINVEKARIDRVLKN				
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	.....	.....	.....	.....	R (43)	R (43)
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	.....	.....	.....	.....	I (3)/R (7)	R (10)
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	.....	.....	.....	.....	S (21)	S (11)/R (10)

Figure 2. Alignment of the peptide sequences of the QRDRs of GyrA and GyrB from *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*. The GyrA QRDR extends from amino acid residues 67 to 106, and the GyrB QRDR extends from amino acid residues 426 to 464, in the numbering system used for *E. coli*.

\*Minimum inhibitory concentration breakpoints adapted from CLSI (2011) for resistant (R), intermediate (I) and susceptible (S) were as follows: CIP (Ciprofloxacin), R  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , I = 2  $\mu\text{g/ml}$ , S  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ ; MXF (Moxifloxacin), R  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , I = 2  $\mu\text{g/ml}$ , S  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ .

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

1) A principal espécie de MCR encontrada neste estudo foi *M. abscessus* subsp. *bolletii*. seguida por *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* e *M. abscessus* subsp. *abscessus*.

2) *M. abscessus* subsp. *bolletii* foi a espécie responsável pelos surtos ocorridos em diferentes cidades (Santo Ângelo, Tramandaí, Santa Maria, Carazinho e Torres) no período de 2007 a 2011, com prevalência de um único clone (BRA 100), relacionado com o principal surto ocorrido no Brasil na cidade do Rio de Janeiro.

3) Para as cepas de *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* e *M. abscessus* subsp. *abscessus* observou-se perfis distintos pela técnica de PFGE.

4) *M. abscessus* subsp. *bolletii* apresentou um elevado nível de resistência aos antibióticos ciprofloxacino, doxiciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, moxifloxacino e tobramicina, cepas multidrogas resistente. As cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* foram totalmente sensíveis apenas a amicacina. O perfil de sensibilidade variou de acordo com as espécies, mas para todas se observou alta resistência.

5) Em relação ao clone BRA100 entre os isolados deste estudo observou-se o surgimento de resistência a claritromicina (14% das cepas resistentes) o que ainda não havia sido relato para este clone.

6) Presença de Ala-83 em GyrA pode ser um importante mecanismo de resistência a FQ para *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

7) A presença de uma Ser- 83 em GyrA não foi suficiente para associar com resistência a FQ para *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*. Dados moleculares não correspondem completamente com dados fenotípicos.

**7 ANEXOS**

## ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 090653                      **Versão do Projeto:** 12/03/2010

**Pesquisadores:**

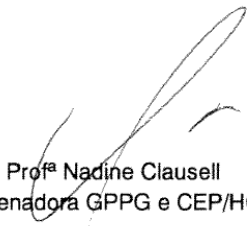
LUCIANA DE SOUZA NUNES

AFONSO LUIS BARTH

**Título:** Caracterização Molecular e Determinação da Suscetibilidade de Micobactérias Não Tuberculosas no Rio Grande do Sul

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 26 de março de 2010.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

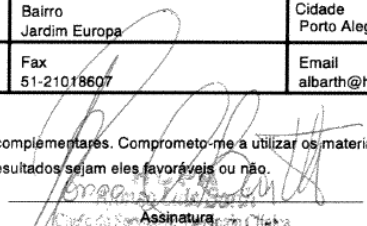
## ANEXO II - Folha de Rosto CONEP

Planos de Saúde - Servidor

Page 1 of 1



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

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 312106	
Projeto de Pesquisa Caracterização Molecular e Determinação da Suscetibilidade de Micobactérias Não Tuberculosas no Rio Grande do Sul					
Área de Conhecimento 2.12 - Microbiologia			Grupo Grupo III		Nível
Área(s) Temática(s) Especial(s)			Fase Não se Aplica		
Unitermos Mycobacterium, MNT, MOOT, genotipagem, resistência					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 50	Total Brasil 50	Nº de Sujeitos Total 50	Grupos Especiais Criança e ou menores de 18 anos,		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NAO	Wash-out NAO	Sem Tratamento Especifico NAO		Banco de Materiais Biológicos SIM
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Afonso Luis Barth		CPF 415.701.540-15		Identidade 9012498748	
Área de Especialização MICROBIOLOGIA CLINICA		Maior Titulação DOUTORADO		Nacionalidade brasileira	
Endereço Av. Tulio de Rose 400/802 bloco B		Bairro Jardim Europa		Cidade Porto Alegre - RS	
Código Postal 91340-110	Telefone 51-21018607 / 51-34070707	Fax 51-21018607		Email albarth@hcpa.ufrgs.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: <u>03/04/2010</u>					
 Assinatura					
Instituição Onde Será Realizado					
Nome Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA		CNPJ/ 87.020.517/0001-20		Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Serviço de Patologia Clínica		Participação Estrangeira NAO		Projeto Multicêntrico NAO	
Endereço Rua Ramiro Barcellos 2350		Bairro Bonfim		Cidade Porto Alegre - RS	
Código Postal 90035003	Telefone (51) 21018000	Fax 51 21017640		Email cep@hcpa.ufrgs.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: _____ Data: ____/____/_____ Assinatura					

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 16/12/2009. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

[Voltar](#)
[IMPRIMIR](#)

## ANEXO III - Trabalhos Publicados em Colaboração

- de-Paris F, Beck C, Machado AB, Paiva RM, da Silva Menezes D, de Souza Nunes L, Kuchenbecker R, Barth AL. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods*. 2012 Dec;186(1-2):189-92. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.07.008.

Journal of Virological Methods 186 (2012) 189–192



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet)



Short communication

### Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates

Fernanda de-Paris<sup>a,b,\*</sup>, Caroline Beck<sup>c</sup>, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado<sup>a</sup>, Rodrigo Minuto Paiva<sup>a</sup>, Denise da Silva Menezes<sup>a</sup>, Luciana de Souza Nunes<sup>b</sup>, Ricardo Kuchenbecker<sup>c</sup>, Afonso Luís Barth<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Patologia Clínica, Unidade de Pesquisa Biomédica – Laboratório de Biologia Molecular, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Rua Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Avaliação de Tecnologia em Saúde/IATS/CNPq, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Rua Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

#### ABSTRACT

##### Article history:

Received 2 May 2012  
Received in revised form 28 June 2012  
Accepted 4 July 2012  
Available online 13 July 2012

##### Keywords:

Respiratory syncytial virus  
Influenza virus  
One-step real-time PCR  
Molecular diagnostics  
Molecular epidemiology

Viruses are major contributors to acute respiratory infection-related morbidity and mortality worldwide. The influenza (IF) viruses and human respiratory syncytial virus (RSV) play a particularly important role in the etiology of acute respiratory infections. This study sought to standardize a one-step duplex real-time RT-PCR technique to optimize diagnosis of IFA/IFB and RSVA/RSVB infection. Viral RNA was extracted with the commercially available QIAamp Mini Kit according to manufacturer instructions. RT-PCR was performed with primers to the matrix protein gene of IFA, the hemagglutinin gene of IFB and the N gene of RSVA and RSVB. The limits of detection were 1 copy/ $\mu$ L for IFA, 10 copies/ $\mu$ L for IFB, 5 copies/ $\mu$ L for RSVA, and 250 copies/ $\mu$ L for RSVB. The specificity of RT-PCR was determined by comparison against a panel of several respiratory pathogens. RT-PCR and indirect immunofluorescence (IIF) were compared in a sample of 250 nasopharyngeal aspirates (NPAs) collected during the year 2010. RT-PCR was more sensitive than IIF and able to detect viral co-infections. In summary, RT-PCR optimized for IFA/IFB and RSVA/RSVB is sensitive and specific for these viral agents and is therefore useful for assessment of the etiology of respiratory infections, whether for clinical or epidemiological purposes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

- Maschmann R de A, Sá Spies F, Nunes L de S, Ribeiro AW, Machado TR, Zaha A, Rossetti ML. Performance of the GenoType MTBDRplus assay directly on sputum specimens from Brazilian patients with tuberculosis treatment failure or relapse. *J Clin Microbiol.* 2013 May;51(5):1606-8. doi: 10.1128/JCM.00364-13.

Journal of  
Clinical Microbiology

**Performance of the GenoType MTBDRplus Assay Directly on Sputum Specimens from Brazilian Patients with Tuberculosis Treatment Failure or Relapse**

Raquel de Abreu Maschmann, Fernanda Sá Spies, Luciana de Souza Nunes, Andrezza Wolowski Ribeiro, Tais Raquel Marcon Machado, Arnaldo Zaha and Maria Lucia Rosa Rossetti

*J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(5):1606. DOI: 10.1128/JCM.00364-13.

Published Ahead of Print 6 March 2013.

Rapid identification of drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* is important in determining treatment for tuberculosis. The aim of this work was evaluate the performance of the GenoType MDRTBplus assay directly on sputum of patients who had treatment failure or relapse in a routine outpatient setting in southern Brazil.



- Teichmann A, Agra HN, Nunes L de S, da Rocha MP, Renner JD, Possuelo LG, Carneiro M, Rieger A, Benitez LB, Valim AR. Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Jan 15;8(1):39-43. doi: 10.3855/jidc.338

### Original Article

## Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil

Aline Teichmann<sup>1</sup>, Homero Neto de Cunha Agra<sup>2</sup>, Luciana de Souza Nunes<sup>1</sup>, Marion Pereira da Rocha<sup>3</sup>, Jane Dagmar Pollo Renner<sup>2</sup>, Lia Gonçalves Possuelo<sup>2</sup>, Marcelo Carneiro<sup>2</sup>, Alexandre Rieger<sup>2</sup>, Lisianne Brittes Benitez<sup>2</sup>, Andréia Rosane de Moura Valim<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>2</sup> *Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Brazil*

<sup>3</sup> *Laboratory Enzilab, Santa Cruz do Sul, Brazil*

### Abstract

**Introduction:** The present study aimed to assess the antibiotic resistance profiles and detect the presence of the *sul2* gene in sulfamethoxazole-susceptible and resistant isolates of *Escherichia coli* obtained from outpatients and inpatients with urinary tract infections.

**Methodology:** The resistance profiles of 739 strains were assessed and the presence of the *sul2* gene in 100 isolates was tested.

**Results:** The antibiotics with the highest resistance rates were ampicillin (57.4%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (44.7%). The presence of the gene *sul2* was detected in 66.7% of outpatient samples and 67.9% of inpatient samples.

**Conclusions:** Our results demonstrate that *E. coli* isolates exhibit high resistance to various classes of antibiotics, highlighting the need for developing strategies to help in prescribing antibiotics.

**Key words:** urinary tract infection; antibiotic agents; resistance

*J Infect Dev Ctries* 2014; 8(1):039-043. doi:10.3855/jidc.3380

(Received 05 February 2013 – Accepted 26 March 2013)

Copyright © 2014 Teichmann *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

- de-Paris F, Beck C, de Souza Nunes L, Machado AB, Paiva RM, da Silva Menezes D, Pires MR, Dos Santos RP, de Souza Kuchenbecker R, Barth AL. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Virology Journal*. 2014 Feb 24;11(1):36.

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

**Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil**

*Virology Journal* 2014, 11:36 doi:10.1186/1743-422X-11-36

**Abstract**

**Background**

Respiratory syncytial virus (RSV) is the main cause of lower respiratory tract illness in children worldwide. Molecular analyses show two distinct RSV groups (A and B) that comprise different genotypes. This variability contributes to the capacity of RSV to cause yearly outbreaks. These RSV genotypes circulate within the community and within hospital wards. RSV is currently the leading cause of nosocomial respiratory tract infections in pediatric populations. The aim of this study was to evaluate the G protein gene diversity of RSV amplicons.

**Methods**

Nasopharyngeal aspirate samples were collected from children with nosocomial or community-acquired infections. Sixty-three RSV samples (21 nosocomial and 42 community-acquired) were evaluated and classified as RSV-A or RSV-B by real-time PCR. Sequencing of the second variable region of the G protein gene was performed to establish RSV phylogenetics.

**Results**

We observed co-circulation of RSV-A and RSV-B, with RSV-A as the predominant group. All nosocomial and community-acquired RSV-A samples were from the same phylogenetic group, comprising the NA1 genotype, and all RSV-B samples (nosocomial and community-acquired) were of the BA4 genotype. Therefore, in both RSV groups (nosocomial and community-acquired), the isolates belonged to only one genotype in circulation.

**Conclusions**

This is the first study to describe circulation of the NA1 RSV genotype in Brazil. Furthermore, this study showed that the BA4 genotype remains in circulation. Deciphering worldwide RSV genetic variability will aid vaccine design and development.

- JCM00549-14 received (2014-02-24 23:19:43) the manuscript "Multidrug and extensively resistant non-tuberculous mycobacteria isolated from cystic fibrosis patients" by Pedro Cândido, Luciana Nunes, Elizabeth Marques, Tania Folescu, Fabrice Coelho, Vinícius de Moura, Marlei da Silva, Karen Gomes, Maria Lourenço, Fábio Aguiar, Fernanda Chitolina, Derek Armstrong, Sylvia Leão, Fernanda Mello, and Rafael Duarte.