



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**DÉBORA CORONA COLOMBO**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA CLARITROMICINA E DA  
AMICACINA NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS BALB/c PELO  
*Mycobacterium massiliense***

Vitória  
2012

**DÉBORA CORONA COLOMBO**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA CLARITROMICINA E DA  
AMICACINA NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS BALB/c PELO  
*Mycobacterium massiliense***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.  
Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Vitória  
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

C718a Colombo, Débora Corona, 1985-  
Avaliação da eficácia da claritromicina e da amicacina no  
tratamento da infecção experimental de camundongos BALB/c  
pelo *Mycobacterium massiliense* / Débora Corona Colombo. –  
2012.  
89 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.  
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Micobactérias. 2. Infecção hospitalar. 3. Agentes  
antiinfecciosos. 4. Camundongo. I. Palaci, Moisés. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda DÉBORA CORONA COLOMBO apresentou a dissertação intitulada “**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA CLARITROMICINA E DA AMICACINA NO TRATAMENTO DA INFEÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS BALB/c PELO *Mycobacterium massiliense***” em sessão pública, no dia 21 de agosto de 2012, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a bióloga DÉBORA CORONA COLOMBO a obter o Grau de **MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS**.

Vitória, ES, 21 de agosto de 2012

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini  
(Membro Externo)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
(Membro Interno)

Prof. Dr. Moises Palaci  
(Orientador)

*Aos meus pais, Dorival e Rosa, que estiveram comigo em todos os momentos da minha vida, pelo apoio, compreensão e paciência, dedico mais uma vitória, com a mais profunda gratidão, admiração e respeito.*

## AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor” (autor desconhecido).

Ao bom Deus, por guiar a minha vida, sempre me mostrando os melhores caminhos e por me amparar nos momentos mais difíceis;

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci por ter aceitado ser meu orientador. Pela dedicação, paciência, confiança e incentivo;

À Solange Alves Vinhas por me acolher no laboratório de micobacteriologia e conduzir-me no caminho da pesquisa. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos e pelo carinho;

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, pessoa por quem tenho grande admiração, pelos valerosos ensinamentos e sugestões que ajudaram a enriquecer esse trabalho. Foi uma honra poder ter contado com sua participação;

Ao Prof. Dr. Davi Jamil Hadad pelos artigos enviados e pelas importantes informações clínicas a respeito do tratamento de pacientes dos surtos causados por MCR;

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Junqueira Kipnis pelo apoio prestado ao longo desses anos de trabalho;

Ao Professor Dr. Ricardo P. Schuenck, do Laboratório de Resistência Bacteriana - UFES, pela disponibilização da cepa de *Staphylococcus aureus*;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação do Núcleo de Doenças infecciosas por contribuírem com minha formação;

À Profª Drª Ethel Leonor Noia Maciel pela valiosa ajuda com as análises estatísticas;

Ao meu companheiro de pesquisa e amigo, Luiz Guilherme Schmidt Castellani, por investir seu tempo precioso no desenvolvimento deste trabalho. Sua ajuda foi crucial e por isso sou mais agradecida do que sou capaz de dizer;

À Marcella Porto pela contribuição com a infecção dos animais e pelas palavras de incentivo;

À Maria José Chiabai, que com a convivência se tornou uma grande amiga, pelos momentos de descontração e pelo auxílio na correção gramatical desta dissertação;

Aos meus amigos Paola Poloni, Hebert Silva Marques, Kamila Olympio, Cristina Paula do Nascimento, Maria Carolina Campana e Fernanda Mattos pela amizade, carinho e incentivo ao longo desses anos;

Aos funcionários do Laboratório de Micobacteriologia, João Batista, Leduc Mageski, Mário e Hildete Nunes por compartilharem comigo um pouco de todo o conhecimento que adquiriram ao longo desses anos de trabalho como técnicos do laboratório;

À funcionária do laboratório de limpeza e esterilização de materiais, Laudicéia, por não medir esforços em me ajudar com a manutenção dos materiais utilizados nos experimentos;

Aos meus colegas de mestrado, Renata Monti Rocha e Lorenzo Stringari por me socorrerem nos momentos em que necessitei emergencialmente de algum material;

Ao motorista do Núcleo de Doenças Infecciosas, Sr. Eliseu, pelas conversas descontraídas e por sempre está disponível nos momentos em que precisei do seu serviço;

Aos técnicos Wallace e Paola Gisela Carvalho, do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF), pelas orientações sobre os cuidados com a manutenção de camundongos e também pela doação de animais para testes;

À Fapes pela concessão da bolsa de mestrado;

À todos aqueles que mesmo de fora, mas sempre presentes, quiseram o meu bem e torceram por mim;

Obrigada!

“A vida nem sempre segue a nossa vontade,  
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

(Chico Xavier)

## RESUMO

Infecções nosocomiais causadas por micobactérias de crescimento rápido (MCR) têm aumentado significativamente nos últimos anos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. No Brasil, a ocorrência de surtos de infecções por MCR foi descrita durante a última década e envolveu, na grande maioria dos casos, uma mesma cepa de *M. massiliense*, denominada BRA100. Essa micobactéria, assim como as demais espécies do grupo MCR, apresenta resistência a um amplo espectro de antimicrobianos, o que limita as opções terapêuticas de tratamento dos pacientes enfermos. Em razão da inexistência de ensaios clínicos que estabeleçam regimes ou esquemas terapêuticos apropriados, as diretrizes atuais para o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos são baseadas nas atividades *in vitro* dos antimicrobianos e em relatos de experiências clínicas de casos. Entretanto, existem variações na correlação entre os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* e a resposta clínica terapêutica observada, o que gera uma polêmica acerca do seu uso para fundamentar a terapia medicamentosa das infecções por MCR. Nesse contexto, realizamos este estudo para avaliar a atividade da claritromicina e da amicacina contra *Mycobacterium massiliense* em camundongos BALB/c infectados. A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) da claritromicina e da amicacina para o isolado de *M. massiliense*, obtido de um surto hospitalar ocorrido em 2007, foi realizada pelo método de microdiluição em caldo Müller-Hinton com ajuste de cátions. Para os testes *in vivo*, camundongos BALB/c foram infectados, via intravenosa, com aproximadamente  $1-2 \times 10^7$  UFC/mL de *M. massiliense*. O tratamento com amicacina ou com lactobionato de claritromicina teve início um dia após a infecção. Os animais receberam diariamente, via subcutânea, 0,1 mL de lactobionato de claritromicina (50mg/kg/12h), ou 0,1 mL de amicacina (100mg/Kg/dia), durante 14 dias, e foram sacrificados 24h-48h após a administração da última dose. Baço e fígado foram removidos para determinação do peso e contagem do N° de UFC ( $\log_{10}$ ) por órgão. Os nossos resultados demonstraram atividade *in vitro* da claritromicina e da amicacina contra o isolado de *M. massiliense*. O tratamento de camundongos BALB/c com claritromicina impediu a evolução da hepatoesplenomegalia, bem como a formação de lesões granulomatosas durante os 15 dias de infecção com *M. massiliense*. Apesar disso, a

claritromicina e mesmo a amicacina não foram eficientes na redução da população bacteriana de *M. massiliense* nos órgãos. A susceptibilidade *in vitro* das bactérias isoladas dos órgãos dos camundongos tratados com lactobionato de claritromicina ou com amicacina e dos camundongos controles foi determinada e demonstrou que não houve o desenvolvimento de resistência induzível a esses antimicrobianos durante o tratamento. Em conclusão, não houve correlação entre as atividades *in vitro* e *in vivo* da claritromicina e da amicacina contra *M. massiliense*.

Palavras-chave: *Mycobacterium massiliense*, tratamento, camundongos.

## ABSTRACT

Nosocomial infections caused by rapidly growing mycobacteria (RGM) have increased significantly in recent years in developed and developing countries. In Brazil, the occurrence of outbreaks due to RGM was reported since last decade. In most cases, a single strain of *M. massiliense*, named BRA100, was the causative agent. *M. massiliense*, as well as other species of the group RGM, is resistant to a broad-spectrum of antimicrobial agents, which limits the therapeutic options for the treatment of patients. Due to the lack of clinical trials to establish appropriate therapeutic regimens, the current guidelines for the treatment of infections caused by these microorganisms are based on *in vitro* antimicrobial activities and clinical case reports. However, there are variations in the correlation between the *in vitro* susceptibility tests results and the therapeutic response observed, which creates a controversy about their use to support the pharmacotherapy of infections by RGM. In this context, we conducted a study to evaluate the activities of clarithromycin and amikacin against *M. massiliense* in BALB/c mice. The Minimal Inhibitory Concentration (MICs) of clarithromycin and amikacin for the *M. massiliense* isolate obtained from a nosocomial outbreak that occurred in 2007, were determined by the broth microdilution assay using cation-adjusted Mueller–Hinton. For *in vivo* tests, BALB/c mice were infected intravenously with  $1 \times 10^7$  to  $2 \times 10^7$  CFU/mL of *M. massiliense*. Treatments with amikacin or clarithromycin lactobionate were initiated one day post-infection. The mice received daily by subcutaneous injection, 0.1 ml of clarithromycin lactobionate (50mg/kg/12h) or 0.1 ml of amikacin (100mg/kg/day) for 14 days. The mice were sacrificed 24 to 48h after administration of the last dose. Spleen and liver were aseptically removed for determination of weight and number of CFU (log<sub>10</sub>) per organ. Our results demonstrated *in vitro* activities of clarithromycin and amikacin against the *M. massiliense* isolate. Treatment of BALB/c mice with clarithromycin prevented the development of hepatosplenomegaly, as well as the formation of granulomatous lesions for 15 days of infection with *M. massiliense*. Nevertheless, the clarithromycin and even amikacin were not effective, inducing no reduction of the bacterial population of *M. massiliense* in the organs. The *in vitro* susceptibility for bacteria isolated from organs of the mice demonstrated that there was no development of inducible resistance to clarithromycin and amikacin during

the treatment. In conclusion, there was no correlation between the activities *in vitro* and *in vivo* of clarithromycin and amikacin against *M. massiliense*.

Keywords: *Mycobacterium massiliense*, treatment, mice.

## SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	do inglês “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
<b>CAMHB</b>	do inglês “Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth”
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CIM<sub>90</sub></b>	Concentração Inibitória Mínima de 90%
<b>CLSI</b>	do inglês “Clinical and Laboratory Standards Institute”
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>et al.</b>	e colaboradores
<b>HCL</b>	Ácido clorídrico
<b>H-E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HIV</b>	do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
<b><i>hsp65</i></b>	do inglês “ <i>heat-shock protein 65 gene</i> ”
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>Log<sub>10</sub></b>	logaritmo na base 10
<b>M</b>	Molaridade
<b>MAC</b>	do inglês “ <i>Mycobacterium. avium complex</i> ”
<b>MCR</b>	Micobactéria de Crescimento Rápido
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MNT</b>	Micobactérias não Tuberculosas
<b>MOTT</b>	Outras micobactérias que não <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>N</b>	Normalidade
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NCCLS</b>	do inglês “National Committee for Clinical Laboratory Standards”
<b>nm</b>	nanômetro
<b>OADC</b>	do inglês “Oleic Acid Albumin Dextrose Complex”
<b>PCR</b>	do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
<b>pH</b>	<i>Potencial de hidrogênio iônico</i>
<b>PRA-<i>hsp65</i></b>	do inglês “PCR-restriction enzyme analysis”

<b>rRNA</b>	do inglês “Ribosomal ribonucleic acid”
<b><i>rpoB</i>:</b>	do inglês “RNA polymerase B’ subunit gene”
<b>sc</b>	via subcutânea
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitros
<b>µm</b>	micrômetro
<b>°C</b>	grau Celsius

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da microplaca e conteúdo dos poços.....44
- Figura 2:** Média de peso  $\pm$  DP dos fígados de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após infecção com *M. massiliense*.....58
- Figura 3:** Média de peso  $\pm$  DP dos baços de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após infecção com *M. massiliense*.....58
- Figura 4:** Tamanho dos baços de camundongos controles e tratados com lactobionato de claritromicina.....59
- Figura 5:** Média de UFC ( $\log_{10}$ )  $\pm$  DP dos fígados de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após infecção com *M. massiliense*.....60
- Figura 6:** Média de UFC ( $\log_{10}$ )  $\pm$  DP dos baços de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após infecção com *M. massiliense*.....60
- Figura 7:** Corte histológico do fígado de camundongos infectados com *M. massiliense* após coloração com HE, mostrando a quantidade de granulomas presente nos tecidos dos animais tratados com lactobionato de claritromicina, NaCl 0,9% e amicacina.....61
- Figura 8:** Média de UFC ( $\log_{10}$ )  $\pm$  DP dos fígados de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após infecção com *S. aureus*.....63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Perfis de susceptibilidade das espécies de micobactérias de crescimento rápido mais prevalentes em infecções humanas.....	29
<b>Tabela 2:</b> Concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos testados frente ao isolado de <i>M. massiliense</i> .....	56
<b>Tabela 3:</b> Interpretação das concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos testados.....	56
<b>Tabela 4:</b> Concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos testados para <i>M. massiliense</i> isolado dos camundongos BALB/c.....	62

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	20
2.REVISÃO DE LITERATURA .....	72
2.1.Susceptibilidade <i>in vitro</i> das MCR .....	28
2.2.Resistência das MCR aos antimicrobianos.....	30
2.3.Regime de tratamento recomendado para infecções por MCR .....	32
<i>Mycobacterium abscessus</i> .....	33
<i>Mycobacterium chelonae</i> .....	34
<i>Mycobacterium fortuitum</i> .....	35
<i>Mycobacterium massiliense</i> .....	35
<i>Mycobacterium bolletii</i> .....	36
2.4.Correlação entre resposta <i>in vitro</i> e resposta clínica .....	37
3.OBJETIVOS .....	39
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1.Animais.....	42
4.2.Obtenção do isolado de <i>Mycobacterium massiliense</i> .....	42
4.3.Ensaio <i>in vitro</i> : testes de susceptibilidade para <i>M. massiliense</i> .....	42
4.3.1.Antimicrobianos .....	43
4.3.2.Preparo das Microplacas .....	43
4.3.3.Inoculação dos isolados nas microplacas .....	44
4.3.4.Leitura e Interpretação dos resultados:.....	46
4.4.Ensaio <i>in vivo</i> .....	46
4.4.1.Preparo da suspensão de <i>M. massiliense</i> .....	46
4.4.2.Infecção dos animais .....	47
4.4.3.Preparo dos agentes antimicrobianos:.....	48
4.4.4.Administração dos antimicrobianos nos camundongos .....	48
4.4.5.Determinação do número de UFC nos órgãos.....	49
4.4.6.Histologia .....	50
4.4.7.Teste de susceptibilidade para os isolados de camundongos .....	50
4.5.Controle experimental da ação <i>in vivo</i> dos antimicrobianos .....	50
4.5.1.Preparo da suspensão de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51
4.5.2.Infecção dos animais. ....	51

4.5.3.Preparo dos antimicrobianos .....	52
4.5.4.Administração dos antimicrobianos nos camundongos .....	52
4.5.5.Determinação do número de UFC no fígado .....	52
4.6.Análises estatísticas .....	53
5.ASPECTOS ÉTICOS .....	54
6.RESULTADOS .....	55
6.1.Atividade <i>in vitro</i> da amicacina e da claritromicina contra <i>M. massiliense</i> .....	56
6.2.Atividade <i>in vivo</i> da amicacina e da claritromicina contra <i>M. massiliense</i> .....	57
6.3.Atividade <i>in vivo</i> da amicacina e da claritromicina contra <i>S. aureus</i> .....	62
7.DISSCUSSÃO .....	64
8.CONCLUSÕES .....	72
9.PERSPECTIVAS .....	74
10.REFERÊNCIAS .....	76

Nota: As espécies *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium bolletii* descritas por Adekambi e colaboradores em 2004 e 2006, respectivamente, foram documentadas com essas denominações em diversos artigos científicos até 2009 quando estudos de biologia molecular, realizados por Leão e colaboradores, redefiniram a classificação taxonômica desses microrganismos. Como consequência, todos os isolados com o perfil de PRA-*hsp65* de *M. abscessus* II e também aqueles identificados por sequenciamento do gene *rpoB* como *M. massiliense* ou *M. bolletii* passam a se chamar *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Para evitar possíveis confusões geradas pelo uso de artigos publicados anteriormente à alteração do nome, a denominação antiga (*M. massiliense*) foi mantida nesta dissertação. Entretanto, para fins de publicação, será utilizada a denominação atual (*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*).

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

As micobactérias são organismos que pertencem à classe Actinomycetes, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, e ao gênero *Mycobacterium*. Apresentam-se como bacilos retos ou ligeiramente curvos, medindo de 0,2 a 0,4 µm de largura e 1 a 10 µm de comprimento. São aeróbios, imóveis e não possuem esporos ou cápsulas. Estas bactérias diferem de outros gêneros bacterianos em uma série de propriedades, muitas das quais diretamente relacionadas com a quantidade e tipos de lipídeos presentes em sua parede celular. Estima-se que, aproximadamente, 60% do seu peso seco sejam devido aos ácidos graxos tais como ácidos micólicos e ceras (CONNELL; NIKAIDO, 1994; BRENNAN; NIKAIDO, 1995; MARTÍNEZ; TORELLO; KOLTER, 1999) o quais lhes conferem resistência peculiar ao álcool-ácido, evidenciada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen e resistência a álcalis, ácidos, anti-sépticos e um amplo espectro de antibióticos (KENT; KUBICA, 1985).

O gênero *Mycobacterium* compreende 156 espécies e 13 subespécies (EUZÉBY, 2011), que podem ser divididas em dois grupos com base no tempo de crescimento: as micobactérias de crescimento lento e as micobactérias de crescimento rápido. Micobactérias de crescimento lento são aquelas que requerem mais de sete dias de incubação para formar colônias visíveis em meio sólido, a partir de um inóculo diluído. Micobactérias de crescimento rápido (MCR) são definidas como micobactérias que requerem até sete dias de incubação para formar colônias visíveis em meio sólido a partir de um inóculo diluído (STAHL; URBANCE, 1990).

Quanto à sua patogenicidade para o ser humano, as micobactérias podem ser classificadas em 3 grupos: o primeiro grupo inclui as espécies de micobactérias estritamente patogênicas (obrigatoriamente patogênicas) a humanos e animais. O segundo grupo inclui as espécies potencialmente patogênicas a humanos e animais. São, portanto, chamadas de "micobactérias oportunistas" ou mesmo "patógenos ocasionais" para distingui-los dos patógenos obrigatórios. O terceiro grupo compreende as espécies de micobactérias saprófitas, não patogênicas, que apenas

em casos excepcionais causam doenças a humanos e animais (LEÃO et al., 2004; HARTMANS; DE BONT; STACKEBRANDT, 2006).

Excetuando as espécies de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* e o *M. leprae*, todas as outras espécies são vulgarmente chamadas micobactérias outras que não do Complexo *M. tuberculosis* (MOTT), micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT) ou micobactérias ambientais (VAEREWIJCK et al., 2005) e são comumente associadas aos ecossistemas naturais como solo, aerossóis, alimentos e água (rios, lagos e água tratada). Portanto, tais espécies podem colonizar transitoriamente as superfícies mucosas de indivíduos imunocompetentes, equipamentos médicos, broncoscópicos, soluções para assepsia e materiais cirúrgicos (OSUGUI, 2001; SEABRA et al., 2002; BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2002; WINTHROP et al., 2002; KATOCH, 2004; SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2005). Como as MNT não são transmitidas de hospedeiro para hospedeiro – homem-homem ou animal-homem – seus reservatórios no ambiente são também considerados suas fontes de infecção (GRIFFITH et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004).

Muitas espécies de MNT são reconhecidos patógenos humanos desde o início do último século (FALKIHAM III, 1996; KATOCH, 2004). As doenças causadas por essas micobactérias incluem as formas pulmonares e disseminadas, endocardite, feridas cirúrgicas e traumáticas, doenças de pele e de tecidos moles, meningite e infecções relacionadas a cateter intravenoso (FALKIHAM III, 1996; WINTHROP et al., 2002; GENTRY, 2005).

A prevalência das espécies de MNT responsáveis por diferentes doenças variam muito por região geográfica. Nos EUA, por exemplo, micobactérias do Complexo *M. avium-intracellulare* (MAC) são as espécies mais comuns (GRIFFITH et al., 2007), enquanto que na Inglaterra e Escócia, *M. kansasii* e *M. malmoense* são, respectivamente, as mais frequentes (BRITISH THORACIC SOCIETY, 2000).

No Brasil não há dados oficiais sobre a frequência das infecções causadas por MNT, visto que essas doenças não são de notificação obrigatória. Dessa forma, os dados

existentes provêm de estudos realizados por alguns centros de referência no país (LEÃO; GRINBAUM, 2009a).

A maioria das MNT de interesse clínico, que também são responsáveis pela maioria dos casos de infecção por MNT, é de crescimento lento. Os casos de infecção por MNT de crescimento lento em humanos mais relatados envolvem as espécies: complexo *M. avium-intracellulare* (MAC), *M. kansasii*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. ulcerans* e *M. xenopi* (STAHL; URBANCE, 1990; HARTMANS; DE BONT; STACKEBRANDT, 2006; GRIFFITH et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Embora as micobactérias de crescimento rápido (MCR) sejam menos relacionadas a doenças (HARTMANS; DE BONT; STACKEBRANDT, 2006), o aumento progressivo do número de casos relatados, desde o primeiro relato por Da Costa Cruz em 1938, tem demonstrado a importância emergente desses patógenos tanto em surtos como em casos esporádicos (VILLANUEVA et al., 1997; DE GROOTE; HUITT, 2006).

As espécies de MCR mais relacionadas às infecções em humanos são: *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. massiliense*, *M. immunogenum*, *M. mucogenicum* e *M. smegmatis*. (STAHL; URBANCE, 1990; BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2002; DE GROOTE; HUITT, 2006; GRIFFITH et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; CHAN, 2010). Essas espécies têm sido isoladas de casos esporádicos de doença pulmonar crônica associada à bronquiectasia e fibrose cística, infecções cutâneas disseminadas e infecções de feridas pós-cirúrgicas. Elas também têm sido relatadas em surtos após injeção intramuscular, cirurgias oftalmológicas, cardíacas e plásticas ou outros procedimentos como acupuntura e pedicure, além de pseudo-surtos relacionados às contaminações de broncoscópios e endoscópios gastrintestinais flexíveis (BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2002; KEVIN et al., 2002; ARA et al., 2003; FREITAS et al., 2003; TIWARI et al., 2003; SNIEZEK et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006a,c; SONG, 2006 et al.; KIM et al., 2007).

No Brasil, a ocorrência de surtos de infecções causadas por MCR, relacionadas aos cuidados com a saúde (hospitalares e não hospitalares), tem sido constatada em

várias cidades desde 1998 (FREITAS et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006a,b,c; PADOVEZE et al., 2007; CARDOSO et al., 2008; VIANA-NIERO et al., 2008; DUARTE et al., 2009;). Cinco grandes surtos de infecções pós-cirúrgicas foram descritos durante a última década no país, todos envolvendo o complexo *M. abscessus*. O primeiro surto ocorreu no período de 2004 a 2005 no estado do Pará (PA) em que um aumento no número de micobactérias de crescimento rápido isoladas deu início a uma investigação epidemiológica que identificou 311 pacientes com sinais e sintomas de infecção localizada por MCR. Todos esses pacientes foram submetidos a algum tipo de procedimento invasivo, como cirurgias videolaparoscópicas e mesoterapia. Dos 311 pacientes suspeitos, foram obtidas 83 culturas positivas para MCR inicialmente identificadas como *M. abscessus* tipo II pelo método do PRA-*hsp65*. Posteriormente, esses isolados foram sequenciados e genotipados por Viana-Niero e colaboradores (2008), que identificou dois surtos simultâneos: um relacionado à cirurgias, causado por uma única cepa de *M. massiliense* que envolveu 298 pacientes, e outro relacionado à mesoterapia, causado por múltiplas cepas de *M. bolletii* que envolveu cerca de 14 pacientes (VIANA-NIERO et al., 2008).

O segundo surto descrito ocorreu entre 2005 e 2007, em Goiânia, e consistiu em infecção do sítio cirúrgico após os procedimentos de artroscopia e laparoscopia. Foram isolados exsudatos de abscessos cutâneos de 18 pacientes de sete hospitais privados. Os 18 isolados foram identificados como *M. massiliense*. Os achados clínicos mais relevantes foram lesões múltiplas, com drenagem de secreção, dor, eritema e febre. Não foram relatadas infecções generalizadas ou morte associada à infecção (CARDOSO et al., 2008).

O terceiro e maior surto pós-cirúrgico de infecção por *M. massiliense* já descrito ocorreu no estado do Rio de Janeiro, entre agosto 2006 e julho de 2007, envolvendo 63 hospitais. Neste surto foram avaliadas as cirurgias mais frequentemente associadas com as infecções de partes moles pós-cirúrgicas, como colecistectomia, laparoscopia diagnóstica, apendicectomia, artroscopia, ooforectomia, ooforoplastia, hernioplastia, ligação tubária, miomectomia, gastroplastia, retosigmoidectomia e outros procedimentos vídeoassistidos. Foram 1051 casos possíveis, com 197 casos

positivos, confirmados pelo exame de baciloscopia e/ou técnicas de cultura. Trinta e oito hospitais tiveram casos confirmados por cultura de micobactérias, com um total de 148 isolados disponíveis recuperados de 146 pacientes. A maioria desses isolados (n=144; 97,2%) foram identificados como *M. massiliense* pelas técnicas de PRA-*hsp65* e sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpoB*. Os pacientes apresentaram lesões cutâneas múltiplas ou únicas, com drenagem de secreção serosa, purulenta ou sanguinolenta. Os pacientes ainda apresentaram outros sinais e sintomas: eritema, nódulos subcutâneos, dor local, abscesso subcutâneo, febre, edema, fístulas e úlceras. A tolerância do *M. massiliense* ao glutaraldeído a 2% foi documentada, sendo a ela atribuída a melhor hipótese para a causa do surto (DUARTE et al., 2009).

Um quarto surto ocorreu na região metropolitana de Vitória – Espírito Santo, no ano de 2007, com notificação de 244 casos, dos quais 100 isolados foram identificados como *M. massiliense* (ANVISA, 2008).

O quinto surto ocorreu entre agosto de 2007 e janeiro de 2008, com notificação de 131 pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, em hospitais particulares localizados na cidade de Curitiba, Paraná. Todos os pacientes apresentaram sinais de infecções pós-cirúrgicas clinicamente sugestivas de MCR, tais como feridas cutâneas, inflamação local, presença de abscesso e ausência de resposta ao tratamento antimicrobiano utilizado comumente em casos de infecções cutâneas. Do total, 49 isolados foram identificados como *M. massiliense* (ANVISA, 2011; MONEGO, 2011).

A semelhança entre as características clínicas e microbiológicas dos surtos ocorridos em várias cidades brasileiras (PA, RJ, ES e PR) levantou uma suspeita que foi investigada e confirmada por Leão e colaboradores (2010): os surtos foram causados por clones de uma mesma cepa de *M. massiliense*, denominada BRA100 (LEÃO et al., 2010). Esses surtos simultâneos no país, causados pela mesma espécie de MCR e envolvendo centenas de pacientes, formam um cenário epidemiológico inédito, pois os casos descritos até então envolveram relativamente

poucos pacientes e foram restritos a uma cidade, região ou estado (FREITAS et al., 2003; SAMPAIO, 2006b; PADOVEZE et al., 2007).

*M. massiliense* foi descrito pela primeira vez por Adekambi et al. (2004) e foi isolado do escarro e fluido broncoalveolar de uma paciente com pneumonia hemoptóica. Nos últimos anos, estudos genéticos permitiram a revisão da sua taxonomia e como consequência a classificação das espécies *M. abscessus*, *M. bolletii* e *M. massiliense* em uma única espécie com duas subespécies: *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Esta última inclui todos os isolados com o perfil de *M. abscessus* II pelo método de PRA-*hsp65* e também aqueles identificados por sequenciamento do gene *rpoB* como *M. massiliense* ou *M. bolletii* (LEÃO et al., 2009b; 2011). De acordo com essa mudança, a cepa predominante nos surtos de infecções cirúrgicas em diferentes estados brasileiros passa a ser atribuída à espécie *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

As MCR são resistentes a uma ampla gama de antimicrobianos, o que limita as opções terapêuticas para o tratamento dos pacientes enfermos. Dependendo da susceptibilidade dos isolados e das manifestações clínicas, o tratamento das infecções causadas por MCR inclui, muitas vezes, uma abordagem cirúrgica para remoção de abscessos e/ou retirada de próteses e cateteres associados à infecção e ao uso de antibióticos selecionados com base em testes de susceptibilidade. (ANVISA, 2007; GRIFFITH et al., 2007; PINHEIRO, 2009).

Dentre os agentes antimicrobianos disponíveis, os macrolídeos e aminoglicosídeos são aqueles que demonstram melhor ação *in vitro* contra a maioria das MCR. Contudo, nem sempre os resultados dos testes *in vitro* de susceptibilidade apresentam boa correlação com a resposta clínica terapêutica. Além disso, ensaios clínicos que seriam decisivos para a definição de esquemas e/ou regimes de tratamento mais adequados contra infecções por MCR, lamentavelmente inexistem.

Diante do exposto acima, faz-se necessário a realização de estudos em modelo animal para avaliar a correlação da resposta *in vivo* dos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por MCR com os resultados *in vitro* dos testes de susceptibilidade.

## *Revisão de literatura*

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Susceptibilidade *in vitro* das MCR

O teste de susceptibilidade para MCR, ao contrário dos testes para micobactérias de crescimento lento, possui uma única metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), fundamentada em dados de estudos feitos com o grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. Essa metodologia deve ser aplicada também para *M. mucogenicum*, o grupo *M. smegmatis* e MCR pigmentadas clinicamente significantes. O método recomendado pelo CLSI, no documento M24-A, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos *in vitro*, é o método de microdiluição em caldo Müller-Hinton, feito em microplaca, utilizando diluições seriadas de fator 2 (NCCLS, 2011). Os métodos de difusão em ágar (disco-difusão e Etest), e microdiluição com caldo Middlebrook 7H9 não devem ser utilizados, pois não há critérios interpretativos ou há limitações quanto à reprodutibilidade (WOODS et al., 2000).

Devido a diferenças na susceptibilidade aos antimicrobianos entre as espécies de MCR e mesmo entre cepas da mesma espécie, o teste para determinação da concentração inibitória mínima dos agentes antimicrobianos é recomendados para todos os isolados de importância clínica, incluindo aqueles oriundos de pacientes apresentando recaída ou falência terapêutica (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1997; HINRICHSEN, 2007; GRIFFITH et al., 2007).

Os antimicrobianos recomendados pelo CLSI no teste de susceptibilidade para MCR são: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolida, moxifloxacino, sulfametoxazol e tobramicina. Porém, os resultados para imipenem não devem ser relatados para *M. chelonae* e *M. abscessus*, pois há dados que indicam uma inconsistência na reprodutibilidade e na interpretação dos resultados dessas espécies para o imipenem. Além disso, a tobramicina deve ser testada apenas para o *M. chelonae*, pois apenas para essa espécie a tobramicina tem demonstrado ser terapeuticamente superior. Caso a cepa seja resistente à tobramicina, os resultados referentes à amicacina podem ser relatados. Outros

agentes antimicrobianos podem ter atividade contra MCR, como por exemplo, amoxicilina e ácido clavulânico, cefmetazol, canamicina, gentamicina, meropenem, gatifloxacina, vancomicina, linezolida e tigeciclina. Entretanto, essas drogas não foram recomendadas pelo CLSI por insuficiência de dados clínicos e/ou laboratoriais para execução e interpretação do teste (NCCLS, 2003a; DE GROTE; HUITT, 2006; GRIFFITH et al., 2007; CLSI, 2011).

Os resultados dos testes de susceptibilidade das MCR (Tabela 1), exceto para claritromicina, são obtidos entre três e quatro dias, e os valores de CIM, bem como a interpretação dos resultados, são baseados em tabelas de ponto de corte propostas pelo CLSI. Para garantir a detecção de resistência induzível aos macrolídeos em MCR, atualmente é recomendado que a leitura final para claritromicina seja feita com pelo menos 14 dias (NCCLS, 2003a; CLSI, 2011).

**Tabela 1 - Perfis de susceptibilidade das espécies de micobactérias de crescimento rápido mais prevalentes em infecções humanas**

Espécies	Amicacina	Cefoxitina	Ciprofloxacina	Claritromicina	Doxiciclina	Imipenem	Linezolida	Sulfametoxazol	Tigeciclina
<i>M. abscessus</i>	S	S	R	S	R	*1	S	R	S
<i>M. massiliense</i>	S	V	R	S	R	*1	V	R	S
<i>M. bolletii</i>	S	V	R	V	R	*1	V	R	S
<i>M. chelonae</i> <sup>*2</sup>	S <sup>1</sup>	R	R	S	R	*1	S	R	S
<i>M. immunogenum</i>	S	R	R	S	R	*1	S	R	S
<i>M. fortuitum</i>	S	S	S	V	V	S	S	S	S
<i>M. houstonense</i>	S	S	R	R	V	S	S	S	S
<i>M. mucogenicum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>M. peregrinum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>M. smegmatis</i>	S	S	V	V	V	S	S	S	S
<i>M. wolinskyi</i>	S	S	V	R	V	S	S	S	S

\*1- A susceptibilidade ao imipenem não deve ser avaliada rotineiramente, em função de sua labilidade durante incubação por quatro dias, tempo usualmente necessário para permitir leitura do

antibiograma de espécies do Grupo *M. chelonae-abscessus*. O imipenem é ativo *in vivo* contra as espécies deste Grupo.

\*2 - Para *M. chelonae*, a tobramicina é mais ativa, *in vitro*, do que a amicacina.

S – Sensível (≥ 90% dos isolados sensíveis); R - Resistente (≥ 90% dos isolados resistentes); V - 11 a 89% dos isolados sensíveis.

Fonte: ANVISA, 2009;

## 2.2 Resistência das MCR aos antimicrobianos

Micobactérias são relativamente resistentes a compostos antimicrobianos devido à parede celular impermeável associada à inativação enzimática das drogas e ao amplo repertório de bombas de efluxo, que caracterizam o gênero (JARLIER; NIKAIIDO, 1994; BANERJEE et al, 2000; PRIMM, LUCERO; FALKINHAM 2004; DE ROSSI; AINSA; RICCARDI, 2006; GUPTA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008).

O desenvolvimento de biofilmes é outra forma importante de resistência a agentes antimicrobianos (TENG; DICK, 2003). Segundo Esteban e colaboradores (2008), a maioria das espécies de MCR apresenta habilidade de formar biofilmes *in vitro* (ESTEBAN et al., 2008).

Ortíz-Pérez e colaboradores (2011) ao estudar a resistência de biofilmes produzidos por MCR contra amicacina, claritromicina e ciprofloxacina em um modelo *in vitro* utilizando cepas de seis diferentes espécies, observou que os biofilmes mostraram-se resistentes aos antibióticos, que são comumente usados para o tratamento de infecções causadas por esses organismos (ORTÍZ-PÉREZ et al., 2011). Outro estudo, realizado por Greendyke e Byrd (2008), mostrou que os biofilmes produzidos por *M. abscessus* foram resistentes à cefoxitina, amicacina e claritromicina. As limitações de nutrientes e um estado metabólico latente foram propostos como responsáveis (GREENDYKE; BYRD, 2008).

Além dos mecanismos intrínsecos (naturais) de resistência, existem os mecanismos genéticos responsáveis por resistência adquirida aos antimicrobianos.

Mutações pontuais nos genes *gyrA* foram destacadas por conferir altos níveis de resistência às fluoroquinolonas em várias espécies de bactérias, incluindo espécies de MCR (REVEL et al., 1994; GUILLEMIN; JARLIER; CAMBAU, 1998; MONEGO; DUARTE; BIONDO, 2012).

Resistência adquirida à amicacina por mutações pontuais na posição 1408 do gene do rRNA 16S (gene *rrs*) também já foi observada em isolados de MCR (PRAMMANANAN et al. 1998; NESSAR et al., 2011).

Um estudo, realizado por Kim e colaboradores (2008), mostrou que de nove cepas de *M. massiliense* submetidas ao teste de susceptibilidade, três se mostraram altamente resistentes à claritromicina. Análises na sequência dessas cepas mostraram uma mutação de ponto na adenina na posição 2058 (A<sub>2058</sub>) ou 2059 (A<sub>2059</sub>) na região peptidiltransferase do gene da porção 23S do rRNA (KIM et al. 2008). Resistência adquirida aos macrolídeos envolvendo o gene 23S do rRNA também já foi documentada em isolados de *M. abscessus* e *M. chelonae* (WALLACE et al., 1996). Entretanto, essas mutações não foram encontradas por Kim e colaboradores (2008) nos quatro isolados de *M. abscessus* e em dois isolados de *M. bolletii* que também se mostraram resistentes à claritromicina no seu estudo. Estes resultados sugerem que existem outros mecanismos além da mutação do gene 23S do rRNA que conferem resistência à claritromicina nestas amostras. (KIM et al., 2008)

Recentemente, alguns estudos demonstraram que os genes que codificam metilases ribossomais (genes *erm*) conferem resistência induzível à claritromicina e eritromicina em *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. mageritense*, *M. abscessus* e *M. bolletii* (NASH, 2003; NASH, 2005 et al.; MADSEN; JAKOBSEN; DOUTHWAITE, 2005; NASH, 2006 et al.; NASH; BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2009;.). A presença e a atividade desses genes não são identificadas pelos métodos padronizados de susceptibilidade *in vitro*. Os efeitos dos genes são apenas revelados *in vitro* se o período de incubação for estendido para 7-14 dias ou se a determinação da CIM do organismo for feita após pré-incubação do isolado em meio

contendo o macrolídeo (NASH; BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2009; BASTIAN et al., 2011).

### **2.3 Regime de tratamento recomendado para infecções por MCR**

A terapia antimicrobiana para as MCR, ao contrário da terapia para a maioria das doenças causadas por micobactérias de crescimento lento, pode variar dependendo da forma clínica em que a doença se apresenta e do sítio de infecção: infecções localizadas ou menores, causadas por MCR, por exemplo, podem ter boas chances de sucesso com o tratamento monoterápico e um menor risco de desenvolvimento de resistência. Já nas formas com comprometimento de tecidos profundos ou presença de abscessos e nódulos, as recomendações de tratamentos incluem a poliquimioterapia por um período mínimo de seis meses com combinações de antibióticos intravenosos e orais e/ou debridamento cirúrgico e remoção de próteses ou qualquer outro corpo estranho. Infecções cutâneas disseminadas ou doenças pulmonares causadas por algumas espécies de MCR normalmente requerem uma politerapia, com uso de antimicrobianos intravenosos e orais. Em alguns casos de infecções pulmonares recomenda-se ainda a remoção cirúrgica do pulmão afetado (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002; GRIFFITH et al., 2007).

Em razão da inexistência de ensaios clínico que estabeleçam regimes ou esquemas terapêuticos mais apropriados, (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002; GRIFFITH et al., 2007) as diretrizes atuais para o tratamento das infecções causadas por MCR são baseadas nas atividades *in vitro* dos antimicrobianos e em relatos e experiências clínicas de casos (VAN INGEN et al., 2009)

As infecções graves podem ser tratadas inicialmente com a associação de cefalosporina de 1ª ou 2ª geração com aminoglicosídeos pela via intravenosa (Ex: cefalotina associada à amicacina). Outras opções são o uso de carbapenêmicos ou de quinolonas. Caso exista a melhora clínica após duas a quatro semanas de tratamento, o paciente pode receber a medicação por via oral (MURILLO et al., 2000; CELDRÁN et al., 2007; GRAVANTE et al., 2008). Em infecções leves e

moderadas, que correspondem à maioria dos casos, o tratamento pode ser feito por via oral, sendo recomendada a associação de claritromicina com um ou dois dos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacino, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina (MURILLO et al., 2000; NEWMAN; CAMBEROS; ASCHERMAN, 2005;).

O debridamento cirúrgico e a drenagem são procedimentos que sempre devem ser realizados quando houver indicação. O objetivo do debridamento cirúrgico é a remoção de todo tecido infectado. Além disso, a retirada das próteses do sítio cirúrgico quase sempre é necessária, pois as micobactérias apresentam a capacidade de formar biofilmes nesses biomateriais, dificultando a eliminação desses microrganismos pelos antimicrobianos e pelo sistema imune (HEISTEIN, et al., 2000; HIAVY; TOBIN, 2002; BRICKMAN; PARSA, A. A; PARSA, F. D, 2005; GRAVANTE et. al., 2008)

O tratamento recomendado para MCR de maior importância clínica é descrito sucintamente a seguir:

### *Mycobacterium abscessus*

Alguns estudos demonstram que nas infecções de pele e partes moles causadas por *M. abscessus* a remoção de corpos estranhos como implantes mamários ou cateteres percutâneos parece ser essencial para o sucesso terapêutico (VILLANUEVA, 1997; FURUYA, 2008; PÔSSA, 2011). Após a realização de debridamento cirúrgico, a antibioticoterapia específica baseada em teste de susceptibilidade (SWENSON et al., 1985) é sugerida devido à resistência do microorganismo aos antituberculosos habituais. As opções de tratamento para essas infecções incluem o uso de claritromicina ou azitromicina combinado com medicamentos intravenosos: amicacina, cefoxitina ou imipenem. Os macrolídeos são os únicos fármacos orais considerados seguros *in vitro* contra *M. abscessus*. A amicacina é considerada a mais ativa dos agentes parenterais. O tempo de tratamento recomendado é de no mínimo 4 meses, com alta probabilidade de cura. (GENTRY, 2005; GRIFFTH et al., 2007).

O tratamento de infecções pulmonares por *M. abscessus* normalmente é feito com associação dos antimicrobianos: amicacina, cefoxitina ou imipenem e claritromicina. Esta associação pode causar melhora dos sintomas e regressão da doença, mas nenhum regime de antibiótico baseado na susceptibilidade *in vitro* tem se mostrado eficaz a longo prazo na permanência de resultado negativo após o tratamento. (GENTRY, 2005; GRIFFITH et al., 2007; VAN INGEN et al., 2009). O uso de outras drogas que mostram susceptibilidade *in vitro*, tais como linezolida e glicilciclinas, aumentam as opções de tratamento. Um pequeno número de pacientes tratados com linezolida em combinação com claritromicina apresentaram resultados encorajadores no estudo de Daley e Griffith (2002). O tratamento cirúrgico pode ser necessário e, se realizado com associação de antibióticos, pode oferecer uma maior chance de melhora do paciente. (GRIFFITH; GIRARD; WALLACE, 1993; GRIFFITH et al. 2007). A persistência de isolados positivos para *M. abscessus* durante a evolução em pacientes recebendo tratamento tem sido relatada, assim como uma pequena taxa de recidiva em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico (VAN INGEN et al., 2009; JARAND et al., 2011).

O tempo de tratamento de 2 a 4 meses parece ser razoável para promover a melhora clínica e radiológica. Os efeitos adversos das medicações são impedimento para manter o tratamento por longo prazo. De modo geral, a doença pulmonar pelo *M. abscessus* é considerada atualmente uma doença crônica incurável para a maioria dos pacientes (GRIFFITH; GIRARD; WALLACE, 1993; GRIFFITH et al. 2007).

### *Mycobacterium chelonae*:

Apesar da monoterapia com claritromicina ter boa chance de sucesso, a American Thoracic Society recomenda o uso desse fármaco com pelo menos mais um agente para evitar a resistência adquirida aos macrolídeos. O segundo agente pode ser definido com base em testes de susceptibilidade *in vitro*. O tempo de tratamento para infecções de pele, tecidos moles e ossos é no mínimo de 4 a 6 meses. Para infecções pulmonares recomenda-se prolongar o tratamento por no mínimo 12

meses de escarro negativo. A remoção cirúrgica de abscessos e a retirada de próteses e cateteres associados à infecção são recomendadas (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1997; GRIFFITH et al., 2007).

### *Mycobacterium fortuitum:*

Infecções causadas por *M. fortuitum* geralmente são mais fáceis de tratar, uma vez que os isolados clínicos apresentam susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos.

O tratamento das formas cutâneas, ósseas e de tecido mole inclui duas drogas intravenosas (imipenem ou cefoxitina combinado com amicacina) como terapia inicial acompanhadas de um macrolídeo por um período de no mínimo 4 meses para garantir alta probabilidade de cura. O uso de ciprofloxacino combinado com amicacina também se mostrou eficaz no estudo de Muthusami e colaboradores (2004). Assim como para as outras MCR, a remoção cirúrgica de abscessos e a retirada de próteses e cateteres associados à infecção são recomendadas e são essenciais para a melhora do quadro (MUTHUSAMI et al., 2004; DE GROOTE; HUITT, 2006; GRIFFITH et al., 2007).

Para a forma pulmonar recomenda-se o uso de dois ou três antibióticos com susceptibilidade *in vitro* por 12-24 meses. Antibióticos intravenosos de curta duração (1-2 meses) acrescidos de um macrolídeo oral com uma fase de continuação e quinolonas por 6-12 meses é um regime que é comumente utilizado por especialistas na área (DE GROOTE; HUITT, 2006).

### *Mycobacterium massiliense*

O regime de tratamento para infecções de pele e partes moles causadas por *Mycobacterium massiliense* foi estabelecido no Brasil face a uma situação emergencial decorrente dos surtos ocorridos no período entre 2004 a 2008.

O protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde tomou por base a patogenia e microbiologia desses patógenos, ou seja: tratamento com regimes de longa duração, por pelo menos seis meses, associando-se claritromicina a um aminoglicosídeo, via de regra a amicacina, e adicionando-se a terizidona ou seu análogo, cicloserina, que são medicamentos bactericidas, antimicobacterianos, e etambutol, de acordo com a susceptibilidade detectada em testes de laboratório. Fármacos como a tigeciclina e linezolida têm mostrado boa ação em testes *in vitro*, porém, seu alto custo e pouca informação clínica desaconselham sua adoção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Em Curitiba, os pacientes receberam uma terapia antimicrobiana combinada baseada em claritromicina, amicacina e terizidona e evoluíram para cura (MONEGO et. al, 2011) .

Em Goiás, os pacientes acometidos pelo surto tiveram uma resposta significativa ao tratamento com uma combinação de terapias antimicrobianas consistindo apenas de claritromicina e amicacina por no mínimo seis meses e sempre que possível, foi associada ao debridamento cirúrgico e remoção de próteses ou qualquer outro corpo estranho. Todos os casos foram curados, embora os efeitos colaterais, tais como a ototoxicidade, desconforto gástrico, e depressão tenham sido observados (CARDOSO et al., 2008).

Nas infecções graves de tecidos profundos ou evidência de disseminação, a ANVISA recomenda o uso de imipenem combinado com claritromicina e amicacina por três a oito semanas. Caso não seja possível utilizar a amicacina, pode ser feita a substituição por tigeciclina (ANVISA, 2009).

### *Mycobacterium bolletii*

Os relatos limitados na literatura no que diz respeito às infecções causadas por *M. bolletii* dificulta a obtenção de informações confiáveis sobre a antibioticoterapia. Dadas as semelhanças com *M. abscessus* e *M. massiliense*, recomenda-se nas infecções por *M. bolletii* o uso de um protocolo similar ao adotado para o tratamento

de infecções causadas por essas duas outras espécies (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; ANVISA, 2009).

## 2.4 Correlação entre resposta *in vitro* e resposta clínica

Os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* possuem variações na sua correlação com a resposta clínica terapêutica, o que gera uma polêmica acerca do seu uso para fundamentar a terapia medicamentosa das infecções por MCR (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002; DE GROOTE; HUITT, 2006; FABRONI; BUGGIANI; LOTTI, 2008).

Alguns pesquisadores têm mostrado, por exemplo, evidências de resistência *in vitro* de *M. fortuitum* aos macrolídeos, que, portanto, não é recomendado na terapia empírica. No entanto, bons resultados clínicos têm sido obtidos quando macrolídeos são combinados com pelo menos um fármaco adicional para o qual o microorganismo apresenta susceptibilidade *in vitro* (DE GROOTE; HUITT, 2006).

Pôssa (2011) após realizar um estudo clínico terapêutico, baseado em uma série de casos de infecções pós-cirúrgicas causadas por *M. abscessus*, observou que apesar de todos os isolados apresentarem resistência *in vitro* à claritromicina, todas as pacientes que foram medicadas com o fármaco em combinação com amicacina evoluíram para cura. Um aspecto relevante a ser destacado, entretanto, é que a evolução dessas pacientes não obedeceu a um padrão: das 14 pacientes estudadas, 14,2% eram assintomáticas antes de dar início ao tratamento e evoluíram com o aparecimento de novas lesões após o início do tratamento; 18,75% das pacientes evoluíram com melhora completa dos sintomas após início do tratamento e 62,5% evoluíram com o aparecimento de novas lesões durante o tratamento e mesmo após o término do tratamento. Estas lesões que surgiram após o tratamento não foram abordadas cirurgicamente e não foi realizado esquema antimicrobiano e mesmo assim elas tiveram resolução espontânea.

Independente da evolução ao tratamento seguir ou não um determinado padrão, as infecções extrapulmonares causadas por *M. abscessus* tendem a evoluir para cura na maioria dos casos. O mesmo, entretanto, não é observado nas infecções pulmonares causadas pela mesma espécie. Vários autores relatam que apesar do uso de uma estratégia terapêutica baseada nos resultados de susceptibilidade *in vitro*, pacientes com infecção pulmonar por *M. abscessus* apresentaram persistência de isolados positivos após tratamento prolongado. Além disso, relatam também que recidivas foram verificadas após conversão da cultura em alguns pacientes (GRIFFITH; GIRARD; WALLACE, 1993; JEON et al., 2009; VAN INGEN et al., 2009; JARAND et al., 2011).

Outro exemplo a ser citado são as infecções por *M. massiliense* que parecem apresentar boa correlação entre os resultados dos testes de susceptibilidade e a resposta clínica (CHO et al., 2010). Entretanto, alguns estudos relataram que pacientes infectados por essa mesma espécie não apresentaram melhora clínica durante o tratamento com claritromicina, sugerindo que a susceptibilidade *in vitro* não refletiu na atividade *in vivo* (KOBASHI et al., 2011; WERTMAN et al., 2011).

# *Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

- 1) Avaliar a atividade da claritromicina e da amicacina contra *Mycobacterium massiliense* em camundongos BALB/c;
- 2) Comparar as atividades *in vivo* e *in vitro* da claritromicina e da amicacina contra *Mycobacterium massiliense*.

## *Materiais e Métodos*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, isentos de microrganismos patogênicos, com idades entre 4 e 8 semanas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) – UNICAMP.

Os animais receberam ração e água filtrada e acidificada com HCL 6N (pH 2-3), *ad libitum*, e foram mantidos em um gabinete para biotério com ventilação e exaustão forçada e com termômetro para leitura da temperatura do ambiente interno.

### 4.2 Obtenção do isolado de *Mycobacterium massiliense*

Para realização deste estudo foi selecionado aleatoriamente, a partir do banco de dados do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI/UFES), uma das cepas BRA100 de *M. massiliense* obtidas do surto de infecções associadas a procedimentos de videocirurgias que ocorreu em 2007, na região metropolitana da Grande Vitória – Espírito Santo.

### 4.3 Ensaio *in vitro*: testes de susceptibilidade para *Mycobacterium massiliense*

A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos utilizados neste estudo foi realizada pelo método de microdiluição em caldo Müller-Hinton suplementado com cátions (CAMHB do inglês *Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth*), de acordo com as recomendações dos manuais do CLSI (NCCLS): M24-A, M24-A2, M7-A6 e M100-S15 (NCLSI, 2003a; NCLSI, 2003b; CLSI, 2005; CLSI, 2011). Além da cepa selecionada, a cepa de referência *Mycobacterium peregrinum*

ATCC 700686 também foi submetida aos testes de susceptibilidade para controle de qualidade.

### 4.3.1 Antimicrobianos

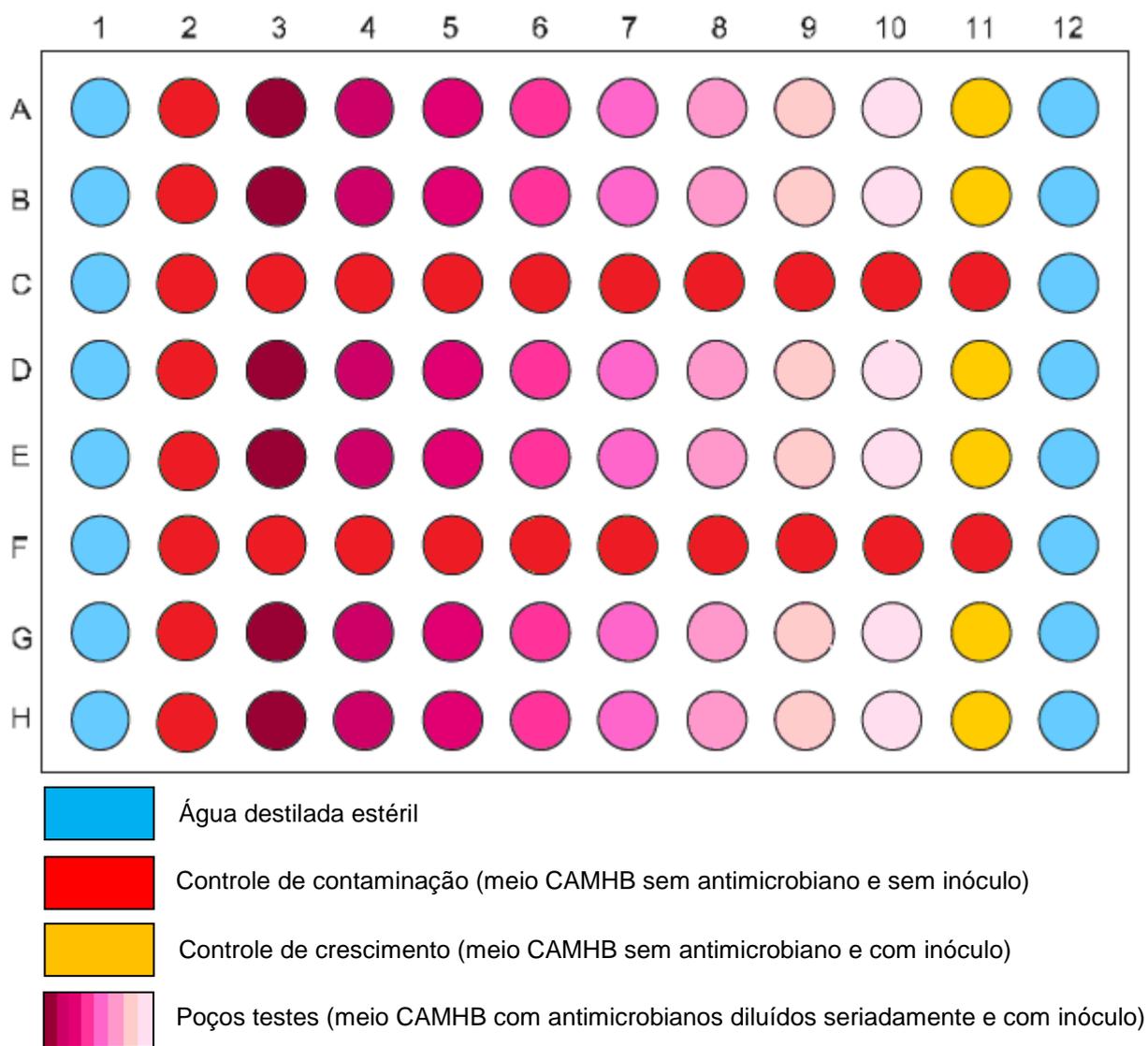
Os antimicrobianos utilizados no estudo e a faixa de concentrações testadas foram: amicacina (Sigma-Aldrich Co., EUA), de 1 a 128 $\mu$ g/mL, claritromicina (Sigma-Aldrich Co., EUA) e lactobionato de claritromicina (Abbott Laboratories, EUA), de 0,0625 a 8 $\mu$ g/mL.

Foram preparadas soluções-estoque nas concentrações de 320 $\mu$ L/mL, 10mg/mL e 20mg/mL para claritromicina, lactobionato de claritromicina e amicacina, respectivamente. Os diluentes utilizados no preparo de cada solução-estoque foram os recomendados pelo CLSI (2005), exceto para o lactobionato de claritromicina que foi diluído conforme recomendações do fabricante. Após o preparo, essas soluções foram imediatamente filtradas em membrana com poro de 0,22 $\mu$ m, aliquotadas em criotubos e armazenadas a -70°C, sob condições estéreis.

### 4.3.2 Preparo das Microplacas

Microplacas contendo 96 poços (12 colunas e 6 linhas) de fundo chato (TPP AG, Suíça) utilizadas para o teste de susceptibilidade foram preenchidas com 200 $\mu$ L de água destilada estéril nas colunas 1 e 12, 200 $\mu$ L de CAMHB na coluna 2 e nas linhas C e F, e 100 $\mu$ L de CAMHB nas colunas 3 a 11. Em seguida, as soluções-estoque dos antimicrobianos foram diluídas em CAMHB (solução de trabalho) até atingir uma concentração 4X maior do que a maior concentração testada. Foram adicionados 100 $\mu$ L da solução de trabalho de cada antimicrobiano nos poços da coluna 3, sendo que: amicacina foi adicionada nas linhas A e B, claritromicina foi adicionada nas linhas D e E e o lactobionato de claritromicina nas linhas G e H (figura 1). Com pipeta multicanal, foi feita a diluição seriada dos antimicrobianos passando 100 $\mu$ L dos poços da coluna 3 até chegar aos poços da coluna 10. Desta

última coluna, foram desprezados 100µL. Terminada a diluição seriada, as placas foram tampadas, guardadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e armazenadas em freezer a -20°C até o momento de sua utilização, sem ultrapassar 30 dias.



**Figura 1.** Esquema da microplaca e conteúdo dos poços.

### 4.3.3 Inoculação dos isolados nas microplacas

A cepa de *M. massiliense* e a cepa de referência de *M. peregrinum* foram subcultivados em meio Ogawa e incubados por quatro dias em estufa a 30°C (modelo 410/4 NDRP, Nova Ética, Brasil) para preparo do inóculo. As placas com os

antimicrobianos foram descongeladas em temperatura ambiente cerca de duas horas antes da inoculação.

Uma alça bacteriológica de cada cultura foi suspensa em água destilada estéril, em tubos com pérolas de vidro. As suspensões foram agitadas vigorosamente em um agitador mecânico (Scientific Industries/Vortex Genie 2) e deixadas em repouso por cinco minutos para decantação dos grumos. A partir do sobrenadante de cada suspensão, foram feitas outras suspensões com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. De acordo com padronizações realizadas no laboratório (dados não mostrados), o padrão 0,5 da escala de McFarland possui uma densidade ótica (DO) de 0,15 ( $\pm 0,01$ ) a 625nm (Espectrofotômetro Microprocessado Visível Digital Bivolt modelo Q 798DRM) e as suspensões bacterianas com DO equivalente possuem uma concentração na ordem de  $10^8$  UFC/mL. Após a obtenção das suspensões com DO equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL), foi feita uma diluição 1:10 em água destilada estéril ( $10^7$  UFC/mL) e depois outra diluição de 1:5 em água destilada estéril ( $2 \times 10^6$  UFC/mL). Dessas suspensões diluídas, foi feita mais uma diluição 1:10 em CAMHB ( $2 \times 10^5$  UFC/mL). Foram adicionados 100  $\mu$ L dessas diluições finais do poço 3 ao poço 11, em todas as linhas das microplacas com antimicrobianos, exceto nas linhas C e F, resultando numa concentração final de  $1 \times 10^5$  UFC/poço. Foi utilizada uma microplaca por cepa. Terminada a inoculação, as placas foram novamente tampadas, guardadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas em estufa a 30°C por 5 dias (amicacina) e 14 dias (claritromicina).

Para confirmar a UFC, a partir de uma alíquota de 100  $\mu$ L do inóculo, foram realizadas diluições em tampão fosfato de 10, 100, 1000, 10000, 100000 e 1000000 vezes. Posteriormente, 60 $\mu$ L das diluições  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  foram plaqueados em meio 7H11 enriquecido com OADC, adicionando-se 2 inóculo de 30 $\mu$ L por quadrante da placa. As placas foram vedadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas em estufa a 30°C por cinco dias.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. O número de colônias na diluição

escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição e expresso em UFC/mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL do inóculo} = n^{\circ} \text{ colônias em } 60 \mu\text{L} \times 16,66 (1000 \mu\text{L}/60 \mu\text{L}) \times 1/\text{diluição}$$

#### 4.3.4 Leitura e interpretação dos resultados

Após 5 dias (amicacina) e 14 dias (claritromicina) de incubação, as placas foram lidas em um suporte com um espelho para visualização do fundo dos poços, de forma que o crescimento bacteriano pudesse ser visto de perto e com maior precisão. A concentração inibitória mínima de cada antimicrobiano, conforme recomendado pelo CLSI (2011), foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano visível. Dessa forma, a concentração do primeiro poço a não apresentar crescimento bacteriano foi considerada a concentração inibitória mínima do antimicrobiano testado.

### 4.4 Ensaios *in vivo*

#### 4.4.1 Preparo da suspensão de *M. massiliense*

A cepa de *M. massiliense* foi descongelada, repicada em meio Ogawa e incubada por cinco dias em estufa a 30°C. Após o crescimento bacteriano, uma alça bacteriológica foi coletada da cultura e suspensa em 3 mL de tampão fosfato (0,067M, pH 6,8) estéril. A suspensão foi agitada vigorosamente em um agitador mecânico por um a dois minutos em tubo com pérolas de vidro, e deixada em repouso por cinco minutos para decantação dos grumos. Com a suspensão sobrenadante, foi realizada outra suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland de modo a atingir uma concentração final na ordem de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Para confirmar a UFC, a partir de uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão resultante foram realizadas diluições em tampão fosfato de 10, 100, 1000, 10000, 100000 e 1000000 vezes. Posteriormente, 60 $\mu\text{L}$  das diluições  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  foram plaqueados em meio 7H11 enriquecido com OADC, adicionando-se 2 inóculos de 30 $\mu\text{L}$  por quadrante da placa. As placas foram vedadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas em estufa a 30°C por cinco dias.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. O número de colônias na diluição escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição e expresso em UFC/mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL do inóculo} = \text{n}^\circ \text{ colônias em } 60 \mu\text{L} \times 16,66 (1000 \mu\text{L}/60 \mu\text{L}) \times 1/\text{diluição}$$

#### 4.4.2 Infecção dos animais

Um total de 3 experimentos independentes com lactobionato de claritromicina e 2 experimentos independentes com amicacina foram realizados.

Para cada experimento, 15 fêmeas BALB/c foram infectadas com 100 $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana contendo  $10^8$  UFC/mL, via intravenosa, pela veia lateral da cauda.

Um dia após a infecção, cinco animais foram sacrificados para determinação dos valores basais de peso e UFC do fígado e baço. Os camundongos remanescentes foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco animais: grupo I - Tratado - recebeu amicacina ou lactobionato de claritromicina e Grupo II – Controle – recebeu solução estéril de NaCl 0,9%.

O modelo de infecção dos animais foi baseado em protocolos descritos previamente para outras micobactérias (SAITO et al., 1994; KOHNO et al., 2007), com algumas modificações.

#### 4.4.3 Preparo dos agentes antimicrobianos

Os antimicrobianos foram preparados nas concentrações de 20mg/mL (amicacina - Sigma-Aldrich Co., EUA) e 10mg/mL (lactobionato de claritromicina - Abbott Laboratories, EUA).

Amicacina foi dissolvida em solução de NaCl 0,9% e o lactobionato de claritromicina foi dissolvido em água e posteriormente diluído em NaCl 0,9%. Após o preparo, essas soluções foram imediatamente filtradas em membranas com poros de 0,22µm, alíquotadas em criotubos e armazenadas a -70°C, sob condições estéreis.

#### 4.4.4 Administração dos antimicrobianos nos camundongos

O tratamento dos animais teve início um dia após a infecção. Nos experimentos com lactobionato de claritromicina, os animais receberam diariamente um volume de 100 µL na dose de 50mg/Kg de peso corporal, a cada 12h. Já para os testes com amicacina, foram usados 100 µL na dose de 100mg/Kg de peso corporal, uma vez ao dia. Os antimicrobianos foram administrados via subcutânea e a escolha da dose de cada um foi baseada em estudos prévios (FERNANDES et al., 1989; LAZARD et al., 1993; COHEN et al., 1995; VRIONI et al., 1998; LOUNIS et al., 2001).

Os animais do grupo controle receberam um volume de 100 µL de solução estéril de NaCl 0,9%, via subcutânea.

O tratamento foi interrompido no 14º dia de infecção e os animais foram sacrificados 24h-48h após a administração da última dose. A escolha do período de tratamento foi baseada em um estudo feito por Sousa (2009), que mostrou que camundongos infectados com *M. massiliense* apresentaram uma queda significativa da carga bacilar a partir do 15º dia, com a resolução completa da infecção antes dos 30 dias.

#### 4.4.5 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos órgãos

Os animais infectados foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> após um dia (Grupo I) e 15 dias (Grupos II e III) de infecção e tiveram o baço e o fígado assepticamente removidos e divididos em dois fragmentos. Os fragmentos de cada órgão foram transferidos para tubos de polipropileno estéreis, previamente identificados e pesados. Os tubos contendo os órgãos foram pesados numa balança analítica e o valor obtido foi descontado do peso do tubo vazio.

Após pesagem, um fragmento de cada órgão foi individualmente macerado em gral com pistilo e diluídos em 2 mL de tampão fosfato. Em seguida, foram realizadas diluições em tampão fosfato de 10, 100, 1000, 10000 vezes e 60µL dessas diluições foram plaqueados em meio 7H11 enriquecido com OADC

As placas foram vedadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas em estufa a 30°C por cinco dias.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. O número de colônias na diluição escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição, volume do macerado e peso dos órgãos, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{UFC/órgão} = n^{\circ} \text{ colônias em } 60 \mu\text{L} \times 33,33 \text{ (} 2000 \mu\text{L}/60 \mu\text{L)} \times 1/\text{diluição} \times \text{peso do órgão inteiro} / \text{peso do fragmento macerado}.$$

O resultado foi expresso em log<sub>10</sub> do número de UFC/órgão.

Os cálculos de UFC e a conversão em log<sub>10</sub> foram realizados por meio do programa Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA).

#### 4.4.6 Histologia

Um fragmento de fígado dos camundongos pertencentes aos grupos tratados e não tratados foram acondicionados em frascos com Bouin diluído 1:4 em salina para fixação. Blocos de parafina foram preparados e secções (4-5 µm de espessura) foram coradas com hematoxilina e eosina (H-E). O número de granulomas foi quantificado em 10 campos microscópicos aleatoriamente selecionados em cada secção, sendo que três secções foram analisadas/grupo. As contagens foram realizadas com uma objetiva de 20X em um microscópio Nikon Eclipse 80i e as imagens foram fotografadas com câmera Q imaging MicroPublisher 5.0 RTV e transferidas para um programa de análise de imagem (Imagem Pro Plus, versão 5). A média do número de granulomas foi calculada por grupo e expressa como média de granulomas/campo. (TANAKA et al., 2000).

#### 4.4.7 Teste de susceptibilidade para os isolados de camundongos

Após contagem das placas para avaliação do número de UFC, alguns isolados do fígado e baço de camundongos de ambos os grupos, tratado e controle, foram escolhidos aleatoriamente para determinação das concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos lactobionato de claritromicina ou amicacina, conforme descrito no item 4.3 deste trabalho. Para tanto, foi preparada uma microplaca de 96 poços por antibiótico, incluindo em cada uma: a cepa de referência de *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686 e os isolados dos camundongos.

### 4.5 Controle experimental da ação *in vivo* dos antimicrobianos lactobionato de claritromicina e amicacina

Para verificar a ação *in vivo* da amicacina e do lactobionato de claritromicina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (um microrganismo sabidamente susceptível a esses antimicrobianos), os seguintes procedimentos foram realizados:

#### 4.5.1 Preparo da suspensão de *Staphylococcus aureus*

A cepa de *S. aureus* foi descongelada, repicada em meio ágar Müller-Hinton e incubada por 24 horas a 37 °C em estufa (NAPCO® Microprocessor Controlled TC Water Jacket CO<sub>2</sub> Incubators Series 6500) com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o crescimento bacteriano, uma alça bacteriológica foi coletada da cultura e suspensa em 3 mL de tampão fosfato (0,067M, pH 6,8) estéril, contido no interior de um tubo com pérolas de vidro. A suspensão foi agitada vigorosamente em um agitador mecânico. A partir dessa suspensão, foi feita outra suspensão com uma densidade ótica (DO) de 0,12 (±0,01) a 625nm de modo a atingir uma concentração bacteriana na ordem de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Para confirmar a densidade bacteriana final do inóculo, a partir de uma alíquota de 100 µL da suspensão foram realizadas diluições, em tampão fosfato, de 10, 100, 1000, 10000, 100000 e 1000000 vezes. Posteriormente, 20µL das diluições 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> foram plaqueados em meio ágar Müller-Hinton. As placas foram vedadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas por 24h a 37 °C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. O número de colônias na diluição escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição e expresso em UFC/mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL do inóculo} = \text{n}^{\circ} \text{ colônias em } 20 \mu\text{L} \times 50 (1000 \mu\text{L}/20 \mu\text{L}) \times 1/\text{diluição}$$

#### 4.5.2 Infecção dos animais

Doze fêmeas BALB/c foram aleatoriamente divididas em dois grupos de seis animais: Grupo I – Tratado - recebeu amicacina ou lactobionato de claritromicina e Grupo II – Controle – recebeu solução estéril de NaCl 0,9%.

Os animais de cada grupo foram infectados com 100µL da suspensão de *S. aureus* contendo  $10^8$  UFC/mL, via intravenosa, pela veia lateral da cauda. Os animais foram pesados no dia da infecção (dia 0) e no 7º dia de infecção e a mortalidade foi observada durante todo o experimento.

Para cada antibiótico testado foram realizados 2 experimentos independentes.

### **4.5.3 Preparo dos antimicrobianos**

Os antimicrobianos foram preparados conforme previamente descrito no item 4.4.3 deste trabalho.

### **4.5.4 Administração dos antimicrobianos nos camundongos**

O tratamento dos animais teve início um dia antes da infecção e foi interrompido no 6º dia de infecção. Os animais foram sacrificados 24h-48h após a administração da última dose.

Os protocolos de infecção e tratamento foi o mesmo utilizado para os experimentos com *M. massiliense* (item 4.4.4), com adequações baseadas em um estudo prévio de infecção e tratamento de camundongos infectados com *S. aureus* (YANAGIHARA et al., 2008).

### **4.5.5 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) no fígado.**

Os animais infectados foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e tiveram seus fígados removidos e divididos em dois fragmentos. Cada fragmento foi transferido para um tubo de polipropileno estéril, previamente identificado e pesado. Os tubos com os

órgãos foram pesados numa balança analítica e o valor obtido foi descontado do peso do tubo vazio.

Após pesagem, um fragmento de cada órgão foi individualmente macerado em gral com pistilo e diluído em 2 mL de tampão fosfato. Em seguida, foram realizadas diluições em tampão fosfato de 10, 100, 1000, 10000 vezes. 20µL das diluições foram plaqueados em meio ágar Müeller-Hinton e as placas vedadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas e incubadas por 24h a 37 °C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. O número de colônias na diluição escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição, volume do macerado e peso dos órgãos, conforme a fórmula abaixo:

UFC/órgão = nº colônias em 20 µL x 100 (2000 µL/20 µL) x 1/diluição x peso do órgão inteiro/ peso do fragmento macerado.

O resultado foi expresso em log<sub>10</sub> do número de UFC/órgão.

Os cálculos foram realizados por meio do programa Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA).

## 4.6 Análises Estatísticas

Todos os dados foram armazenados em uma planilha do Excel e analisados por meio do programa Stata 9.2 (Ou GraphPad Prism 5). A média e o desvio padrão do peso e UFC dos órgãos foram determinados e a comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5. ASPECTOS ÉTICOS

Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFES), sob protocolo nº 050/2011, e os animais foram manejados e contidos de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

## *Resultados*

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Atividades *in vitro* da amicacina e da claritromicina contra *M. massiliense*

A atividade *in vitro* da claritromicina e da amicacina frente ao isolado de *M. massiliense* utilizado neste estudo foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo Müller-Hinton, recomendada pelo CLSI. Os resultados dos testes demonstraram susceptibilidade à amicacina, à claritromicina e ao lactobionato de claritromicina, conforme mostrado na tabela 2. A interpretação das CIM observadas foi realizada de acordo com a tabela 3.

**Tabela 2: Concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos testados frente ao isolado de *M. massiliense*.**

Antimicrobianos	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	
	<i>M. massiliense</i>	<i>M. peregrinum</i> (ATCC 700686)
Amicacina	16µg/mL	≤ 1µg/mL
Claritromicina	0,125µg/mL	0,25µg/mL
Lactobionato de claritromicina	0,125µg/mL	0,25µg/mL

**Tabela 3: Interpretação das concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos testados**

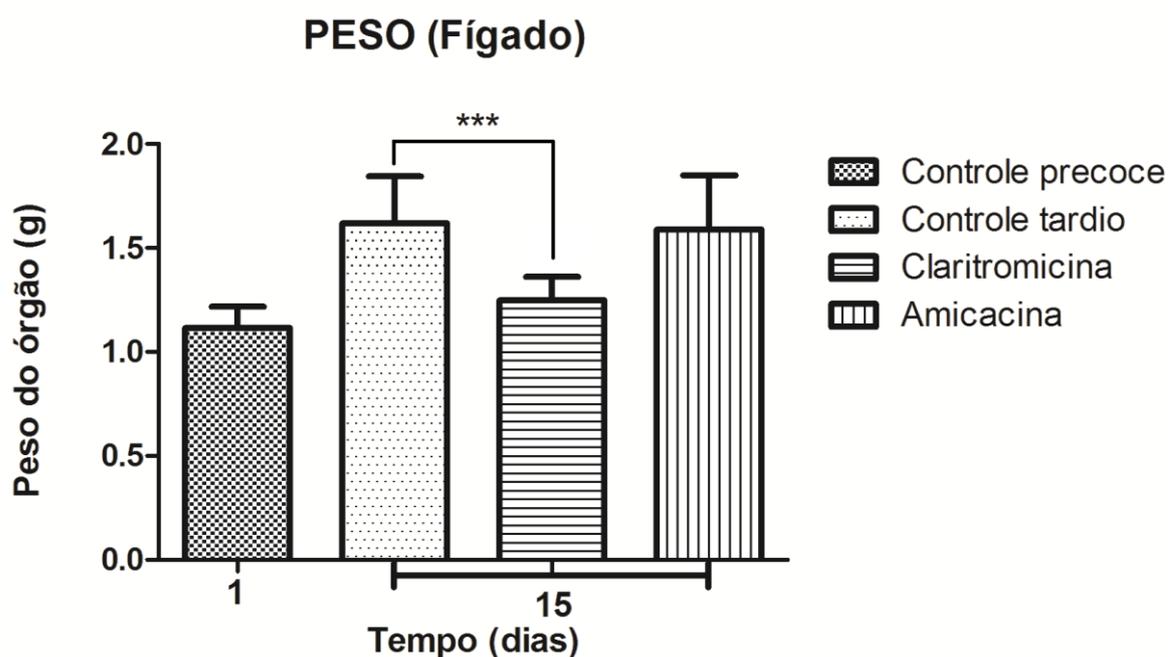
Antimicrobianos	CRITÉRIO DE INTERPRETAÇÃO DAS CIM PARA MCR (µg/mL)			<i>M. peregrinum</i> (ATCC 700686)
	Sensível	Intermediário	Resistente	
Amicacina <sup>§</sup>	≤ 16	32	≥ 64	≤1-4
Claritromicina <sup>§</sup>	≤ 2	4	≥ 8	≤0,06-0,5
Lactobionato de claritromicina <sup>‡</sup>	≤ 2	4	≥ 8	≤0,06-0,5

<sup>§</sup> Critério interpretativo recomendado para MCR (NCCLS, 2003; CLSI, 2011);

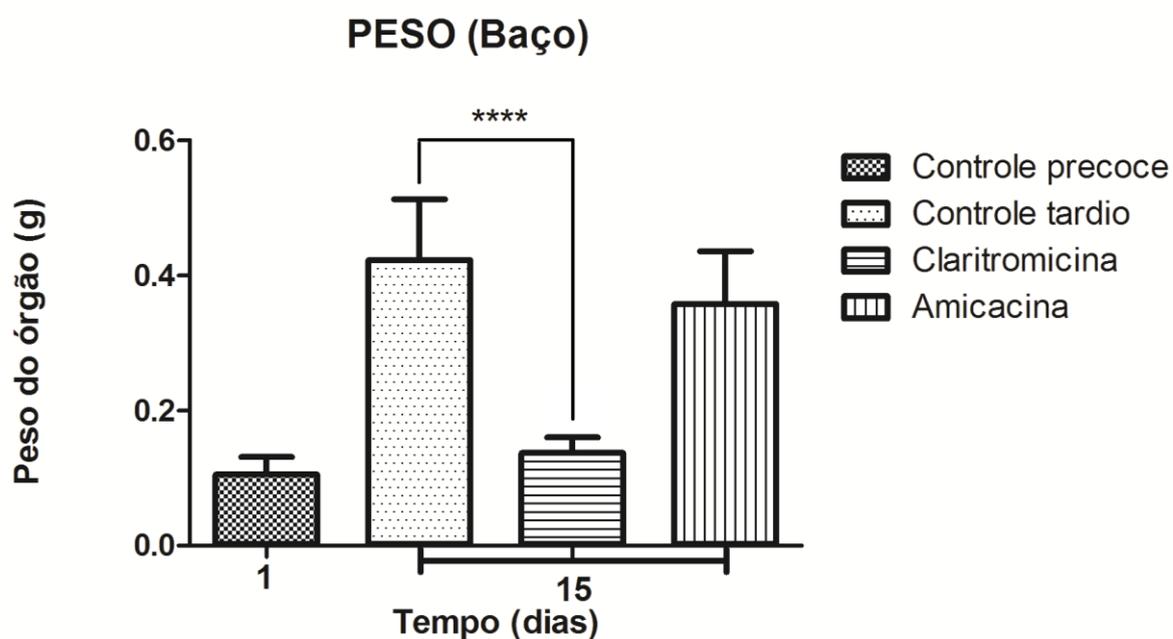
<sup>‡</sup> Critério interpretativo baseado nas recomendações do CLSI para claritromicina.

## 6.2 Atividades *in vivo* da amicacina e da claritromicina contra *M. massiliense*

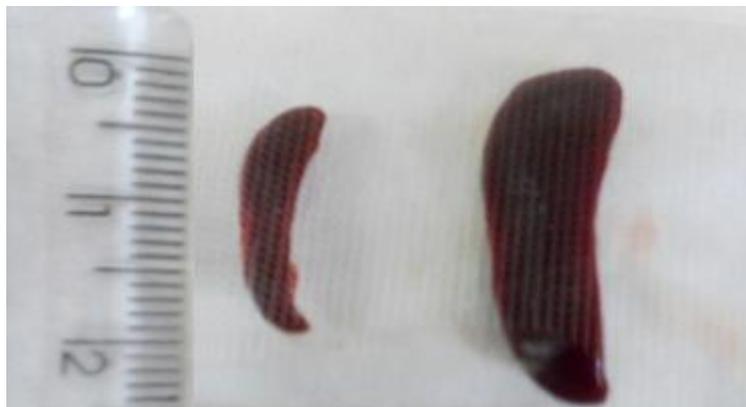
Conforme mostrado nas figuras 2 e 3, a média de peso dos órgãos ( $\pm$ DP) dos camundongos infectados, não tratados com os antimicrobianos avaliados, aumentou de  $1,14\text{g} \pm 0,14$  (fígado) e  $0,11\text{g} \pm 0,023$  (baço), no primeiro dia após a infecção, para  $1,59\text{g} \pm 0,22$  e  $0,43\text{g} \pm 0,08$ , respectivamente, no 15º dia de infecção. Esse aumento considerável no peso dos órgãos também foi observado nos animais infectados e tratados com amicacina, não havendo diferenças significativas entre esses dois últimos grupos. Em contraste, quando os órgãos dos controles foram comparados aos dos camundongos tratados com lactobionato de claritromicina foi notado uma diferença de tamanho entre eles (Figura 4) e a média de peso obtida para esses últimos foi significativamente menor do que a média obtida para os animais tratados com NaCl 0,9% (controles) ( $P < 0,001$  para o fígado;  $P < 0,0001$  para o baço).



**Figura 2.** Média de peso  $\pm$  DP dos fígados de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após 15 dias de infecção com *M. massiliense*. \*\*\*, Diferença significativa em relação ao controle tardio ( $P < 0,001$ ).

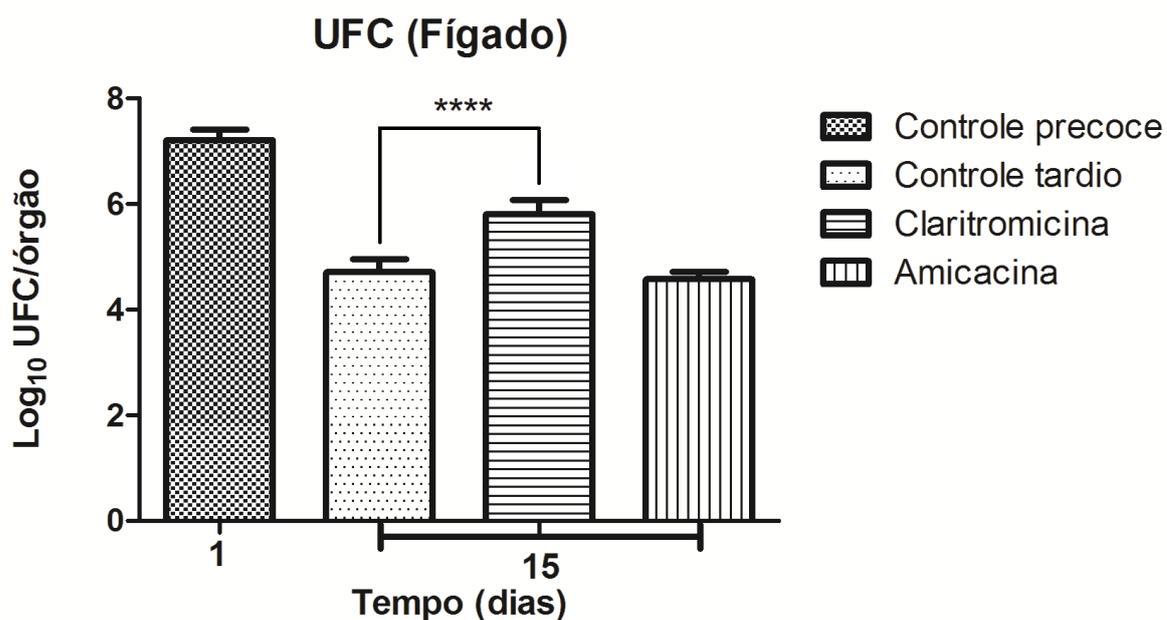


**Figura 3.** Média de peso  $\pm$  DP dos baços de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após 15 dias de infecção com *M. massiliense*. \*\*\*\*, Diferença significativa em relação ao controle tardio ( $P < 0,0001$ ).

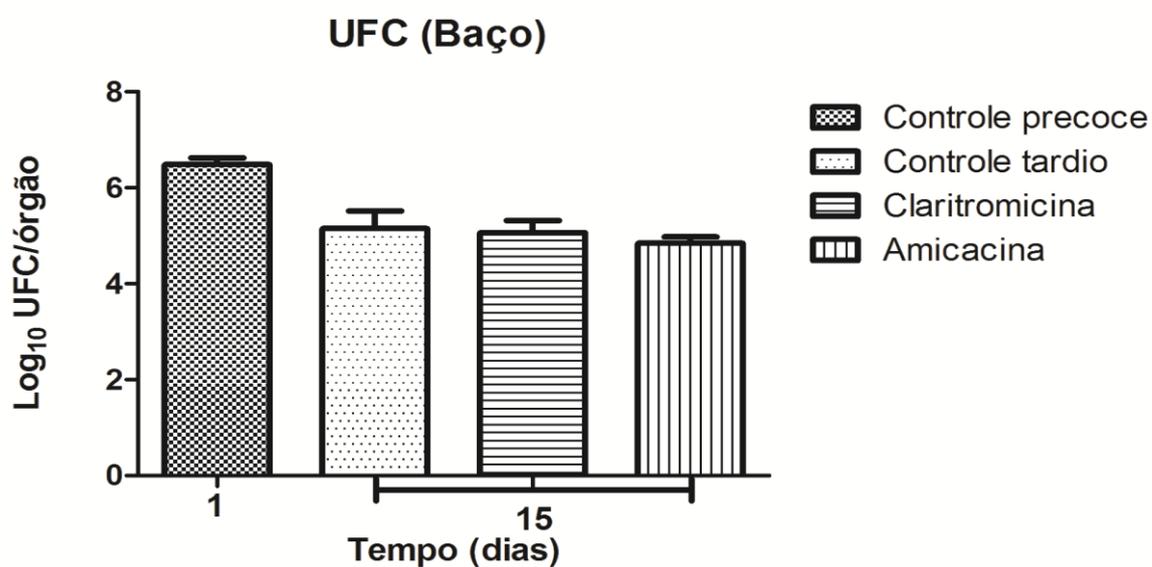


**Figura 4.** Tamanho dos baços dos camundongos tratados com lactobionato de claritromicina (esquerda) e NaCl 0,9% (direita).

Após um dia de infecção com  $1-2 \times 10^7$  UFC de *M. massiliense*, as médias de UFC nos órgãos dos animais controles foi de  $7,21 \pm 0,19 \log_{10}$  (fígado) e  $6,48 \pm 0,14 \log_{10}$  (baço). No 15º dia de infecção os fígados e os baços dos animais tratados com NaCl 0,9% (controles tardios) apresentaram, respectivamente:  $4,71 \pm 0,24 \log_{10}$  e  $5,14 \pm 0,36 \log_{10}$ . Essa diminuição nas UFC após 15 dias de infecção foi observada em todos os grupos (tratados e controles) de maneira que, as médias do número de UFC por órgão entre eles não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. A exceção foi para o número de bactérias encontrado nos fígados dos animais tratados com lactobionato de claritromicina, que se apresentou significativamente maior do que o número observado nos fígados dos animais controles (Figuras 5 e 6).

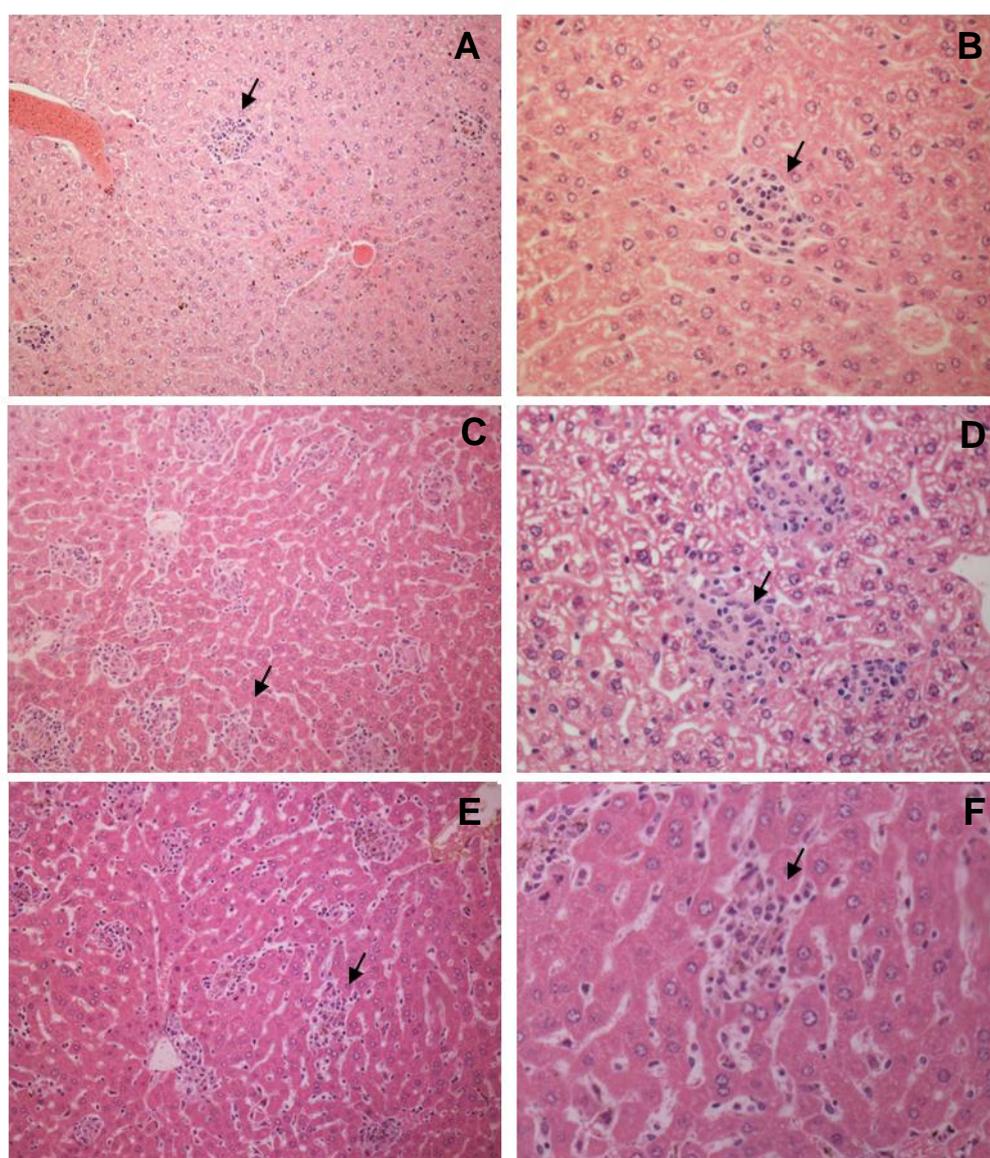


**Figura 5.** Média de UFC ( $\log_{10}$ )  $\pm$  DP dos fígados de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após 15 dias de infecção com *M. massiliense*. \*\*\*\*, Diferença significativa em relação ao controle tardio ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 6.** Média de UFC ( $\log_{10}$ )  $\pm$  DP dos baços de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após 15 dias de infecção com *M. massiliense*.

Quando os fígados dos animais de todos os grupos foram examinados histologicamente após 14 dias de tratamento, um grande número de granulomas foi observado nos animais tratados com NaCl 0,9% (controle) (Média de granulomas/campo: 13) e nos tratados com amicacina (Média de granulomas/campo: 12). Por outro lado, a média de granulomas obtida dos fígados dos animais tratados com lactobionato de claritromicina (Média de granulomas/campo: 3) foi significativamente menor do que as observadas nos órgãos dos animais dos outros dois grupos (Figura 7).



**Figura 7.** Corte histológico do fígado de camundongos infectados com *M. massiliense* após coloração com HE, mostrando a quantidade de granulomas (seta) presente nos tecidos dos animais tratados com lactobionato de claritromicina (A e B), NaCl 0,9% (C e D) e amicacina (E e F). Ampliação: 20X (A, C, E) e 40X (B, D, F).

Com relação aos resultados dos testes de susceptibilidade para os isolados dos órgãos de camundongos tratados e não tratados com os antimicrobianos, conforme mostrado na tabela 4, as CIM para amicacina se mantiveram inalteradas para todos os isolados analisados quando comparada à CIM observada para a cepa de *M. massiliense*, antes da infecção. Para os testes com claritromicina, foi observado um pequeno aumento na CIM, tanto para os isolados dos animais tratados com o lactobionato de claritromicina quanto para os isolados dos animais tratados com NaCl 0,9%. Apesar disso, de acordo com o critério de interpretação das CIM adotado pelo CLSI (Tabela 3), as bactérias continuaram susceptíveis à claritromicina.

**Tabela 4: Concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos testados para *M. massiliense* isolado dos camundongos BALB/c.**

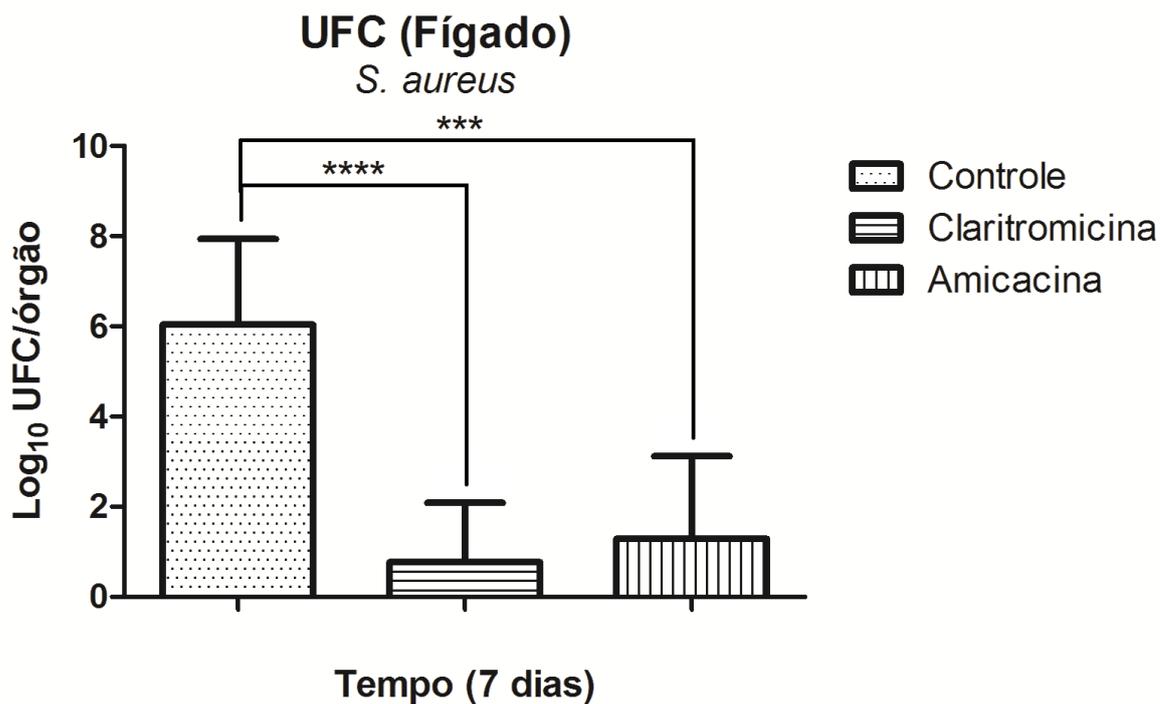
ANTIMICROBIANOS	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)		
	<i>M. massiliense</i> isolado de BALB/c:		<i>M. peregrinum</i> (ATCC 700686)
	Baço	Fígado	
Amicacina	16µg/mL	16µg/mL	≤ 1µg/mL
Claritromicina	0,25µg/mL	0,25µg/mL	0,25µg/mL
Lactobionato de claritromicina	0,25µg/mL	0,25µg/mL	0,25µg/mL

### 6.3 Atividades *in vivo* da amicacina e da claritromicina contra *Staphylococcus aureus*.

Após sete ou oito dias de infecção a mortalidade nos animais controles variou de 50% a 100% para todos os experimentos realizados. Em contrapartida, nenhuma morte foi registrada nos animais tratados com um dos antimicrobianos.

No dia da infecção a média de peso corporal dos animais foi de 20g. Ao final dos 7 dias de tratamento, essa média foi de 19,7g para os animais tratados com lactobionato de claritromicina, 19,86g para os animais tratados com amicacina e de 14,86g para os animais sobreviventes tratados com NaCl 0,9%.

Com relação ao número de UFC/órgão, tanto os camundongos tratados com lactobionato de claritromicina quanto aqueles tratados com amicacina mostraram redução estatisticamente significativa no número de bactérias no fígado quando comparados aos camundongos tratados com NaCl 0,9%. (Figura 8).



**Figura 8.** Média de UFC ( $\log_{10}$ )  $\pm$  DP dos fígados de camundongos BALB/c controles e tratados com lactobionato de claritromicina (50mg/Kg/12h/sc) ou com amicacina (100mg/Kg/dia/sc) após 7 dias de infecção com *S. aureus*. \*\*\*, Diferença significativa em relação ao controle tardio ( $P < 0,001$ ); \*\*\*\*, Diferença significativa em relação ao controle tardio ( $P < 0,0001$ ).

## *Discussão*

## 7. DISCUSSÃO

O número de casos de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido (MCR) tem aumentado significativamente nos últimos anos em diversos países (VILLANUEVA et al., 1997; SUNGKANUPARPH; SATHAPATAYAVONGS; PRACHARKTAM, 2003; DE GROOTE; HUITT, 2006; DE MACEDO; HENRIQUES, 2009). Por outro lado, o conhecimento sobre regimes e/ou esquemas terapêuticos mais apropriados para estas infecções permanece limitado. Como não se dispõe de ensaios clínicos dirigidos a este propósito, o tratamento das infecções inclui, muitas vezes, uma abordagem cirúrgica para remoção de abscessos e/ou retirada de próteses e cateteres e o uso de antibióticos selecionados com base em testes de susceptibilidade *in vitro*. Os resultados desses testes, contudo, nem sempre correspondem à resposta clínica ao tratamento. (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002; DE GROOTE; HUITT, 2006; ANVISA, 2007; GRIFFITH et al., 2007 FABRONI; BUGGIANI; LOTTI, 2008).

Neste contexto, a ação dos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por MCR foi avaliada, neste estudo, por meio do uso de um modelo animal. Utilizamos a cepa de *M. massiliense* (BRA 100) devido a sua susceptibilidade *in vitro* à amicacina e à claritromicina, já descrita em estudos prévios (DUARTE, et al., 2009; LEÃO et al., 2009b; PINHEIRO, 2009) e confirmada em nosso estudo. O lactobionato de claritromicina utilizado nos ensaios *in vivo* também foi incluído nos testes *in vitro* para mostrar que não há diferença de atividade em relação ao sal de claritromicina padrão utilizado para os testes.

Diante da carência, na literatura, de modelos para o tratamento de camundongos infectados com MCR, bem como, da obrigatoriedade da utilização de um grupo controle para comprovar a ação *in vivo* da claritromicina e da amicacina sobre um microrganismo de referência, nós estabelecemos um modelo animal de infecção sistêmica por *Staphylococcus aureus* seguido de tratamento por sete dias com amicacina ou com lactobionato de claritromicina. A escolha de *S. aureus* se deve ao conhecimento prévio de sua susceptibilidade aos antimicrobianos avaliados, à facilidade de condução dos experimentos e à rapidez para obtenção dos resultados.

A eficácia terapêutica foi avaliada com base na prevenção da mortalidade, peso dos animais e UFC/fígado (REYES et al., 2006; YANAGIHARA et al., 2008). Os resultados demonstraram que a mortalidade nos animais do grupo controle variou de 50% a 100% para todos os experimentos realizados, enquanto que nenhuma morte foi registrada nos camundongos tratados com lactobionato de claritromicina ou com amicacina. Diferenças no peso dos animais também foram observadas. Ao contrário dos animais tratados com um dos antimicrobianos, os animais controles apresentaram uma perda considerável de peso devido à gravidade da infecção produzida por *S. aureus*. Além disso, foi observada uma redução significativa no número de UFC tanto nos fígados dos camundongos tratados com amicacina quanto nos fígados daqueles tratados com lactobionato de claritromicina, em relação aos dos camundongos controles. Isso mostra que os tratamentos com amicacina e com claritromicina, isoladamente, tiveram um efeito protetor em camundongos BALB/c infectados com *S. aureus*. Nota-se, assim, que os antimicrobianos foram bem absorvidos e atingiram níveis teciduais (fígado) necessários para inibir o crescimento de *S. aureus* nas doses utilizadas.

Para verificar a ação *in vivo* da claritromicina e da amicacina, isoladamente, em camundongos BALB/c infectados intravenosamente com *M. massiliense*, as médias de peso do baço e fígado e do número de UFC por órgão foram determinadas após 14 dias de tratamento. Os resultados mostraram que a infecção por *M. massiliense* induziu um aumento considerável de peso tanto nos órgãos dos camundongos controles quanto nos órgãos daqueles tratados com amicacina. Em contraste, o peso dos órgãos dos camundongos tratados com lactobionato de claritromicina foi significativamente menor do que o dos animais tratados com NaCl 0,9% (controles), indicando que este antimicrobiano foi capaz de impedir a evolução da hepatoesplenomegalia em BALB/c infectados com *M. massiliense*. Observações semelhantes a essas foram feitas por Vrioni e colaboradores (1998) em camundongos C57BL/6 infectados com *Mycobacterium genavense* após tratamento com amicacina e com claritromicina, isoladamente. Outro achado interessante neste estudo foi que a média de granulomas obtida no fígado dos animais tratados com lactobionato de claritromicina foi surpreendentemente menor do que as observadas

nos órgãos dos animais dos outros dois grupos, revelando a capacidade da claritromicina em reduzir o desenvolvimento dessas lesões.

As diferenças encontradas nos grupos tratados com claritromicina podem ser explicadas pela ação anti-inflamatória desse antimicrobiano. Estudos recentes têm demonstrado que essa atividade imunomoduladora dos macrolídeos é independente da sua ação antimicrobiana e está relacionada com a capacidade desses agentes em ativar fatores de transcrição como, por exemplo, NF- $\kappa$ B e o ativador proteico 1 (AP-1), levando à inibição da produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios e ao aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias. Os macrolídeos parecem ainda estar envolvidos na: redução do acúmulo, adesão e apoptose de neutrófilos, modulação das células dendríticas e supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T, além de inúmeros outros mecanismos pelos quais exercem seu efeito imunomodulador (IANARO et al., 2000; ALTENBURG, et al., 2010; KANOH; RUBIN, 2010; KOVALEVA et al., 2012).

Ao avaliarmos o número de UFC no baço e no fígado de camundongos sacrificados com um dia e com 15 dias de infecção, observamos uma redução no número de bactérias em todos os grupos, o que demonstra que a infecção por *M. massiliense*, em camundongos BALB/c tende a ser autolimitante, como já descrito por Sousa (2009). Em seu estudo, camundongos BALB/c e C57BL/6 imunocompetentes, infectados com *M. massiliense*, controlaram completamente a carga bacteriana antes dos 30 dias de infecção.

Ao compararmos os grupos de animais que receberam um dos antimicrobianos com o grupo de animais controles, verificamos que a amicacina e a claritromicina não se mostraram eficientes contra *M. massiliense*, *in vivo*, após 14 dias de tratamento. Diante dessas observações, isolados de *M. massiliense* obtidos dos camundongos tratados e não tratados com um dos antimicrobianos foram re-submetidos ao teste de susceptibilidade *in vitro* para verificar se haviam adquirido resistência induzível à claritromicina ou à amicacina. De acordo com os nossos resultados, as bactérias mantiveram-se susceptíveis aos antimicrobianos e, por isso, o aparecimento de

isolados resistentes durante o tratamento dos camundongos deixou de ser uma explicação plausível para a falta de resposta adequada ao tratamento.

A amicacina é um antimicrobiano semi-sintético, pertencente à classe dos aminoglicosídeos, e assim como os demais membros da classe, atua pela ligação à subunidade 30S do ribossomo, seguida da interrupção da iniciação da síntese proteica ou indução de leitura errônea do código genético (CHAMBERS, 2005a). Não apresenta metabolização após absorção e sua eliminação ocorre quase que totalmente pelos rins. Apesar de ser incluída em muitos regimes de tratamento, apresenta sua eficácia limitada por sua rápida depuração (*clearance*) da circulação, sua baixa capacidade de penetrar nas células e conseqüentemente atingir altas concentrações intracelulares (PETERSEN et al., 1996). Tais características poderiam justificar a ausência de atividade bactericida contra patógenos intracelulares. Entretanto, alguns estudos mostraram resultados satisfatórios contra *M. avium*, *M. ulcerans* e *M. genavense* (GANGADHARAM et al., 1988; FERNANDES et al., 1989; LOUNIS et al., 1997; VRIONI, et al., 1998; JI et al., 2006).

A claritromicina é um macrolídeo semi-sintético que atua na inibição da síntese de proteína por meio da sua ligação reversível à subunidade ribossômica 50S de microrganismos susceptíveis. Uma vez absorvido, esse antimicrobiano é metabolizado no fígado em vários metabólitos, sendo o metabólito ativo 14-hidroxiclaritromicina o mais importante. É capaz de distribuir-se amplamente por todo o organismo (CHAMBERS, 2005b) e ao contrário da amicacina, demonstra ter excelente penetração intracelular e capacidade para se concentrar no interior das células em níveis muito mais elevados do que a CIM para muitos patógenos intracelulares, inclusive micobactérias (FRÉHEL; OFFREDO; CHASTELLIER, 1997; ALTENBURG, et al., 2010). Estudos prévios mostraram que camundongos infectados intravenosamente com micobactérias de crescimento lento, tais como *M. avium*, *M. genavense*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. malmoense* e *M. xenopi* apresentaram redução de UFC no baço e pulmão quando tratados com claritromicina (FERNANDES et al., 1989; JI et al., 1994; KLEMENS; CYNAMON, 1994; COHEN et al., 1995; VRIONI et al., 1998; LOUNIS et al., 2001). Por outro lado, Fréhel e colaboradores (1997) demonstraram em macrófagos infectados com

cepas virulentas e avirulentas de *M. avium* que, embora a claritromicina esteja presente em altos níveis no interior dessas células, é incapaz de atuar sobre as bactérias virulentas, mesmo após um tratamento prolongado e contínuo. Isso ocorre devido à capacidade das cepas virulentas de prevenir a fusão dos fagossomos, sítio de localização intracelular das micobactérias, com os lisossomas, sítio de acúmulo da claritromicina.

Em oposição aos resultados dos estudos supracitados, realizados com micobactérias de crescimento lento, não verificamos ação *in vivo* da amicacina e a da claritromicina, isoladamente, contra *M. massiliense*. Porém, não podemos estabelecer comparações em razão desses estudos apresentarem diferenças quanto à espécie de micobactéria, linhagem de camundongo, via de administração, dose dos antimicrobianos, início e duração do tratamento após a infecção.

Uma vez que a atividade da claritromicina não foi bactericida ou mesmo bacteriostática, poder-se-ia interrogar o seu valor potencial ou prática da monoterapia no tratamento de infecção por *M. massiliense* e talvez de outras MCR em seres humanos. Entretanto, a carência de dados que expliquem as discrepâncias encontradas entre os resultados aqui obtidos, *in vitro* e *in vivo*, não nos permite levantar essa questão. Além disso, a escassez de trabalhos disponíveis na literatura sobre a farmacocinética desses antimicrobianos em camundongos dificulta o estabelecimento de quaisquer analogias com os mesmos estudos feitos em humanos.

Considerando que a ausência de resposta contra *M. massiliense* pode estar relacionada com os níveis sanguíneos e teciduais atingíveis com as doses dos antimicrobianos administradas, seria interessante a realização de bioensaios para o doseamento desses antimicrobianos no soro e tecidos de camundongos com intuito de averiguar se, nas concentrações utilizadas, é possível obter níveis sanguíneos e teciduais iguais ou superiores à CIM para *M. massiliense*

Outro fator que poderia explicar a diferença entre os resultados *in vitro* e *in vivo* é o fenômeno de tolerância à droga. Esse mecanismo já foi relatado em enterococcos,

*Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, e *Plasmodium falciparum* (KIM; BAYER, 1987; BARKER; SCAIFE; BROWN, 1995; WALLIS et al., 1999; WARNER; MIZRAHI, 2006; CONNOLLY; EDELSTEIN; RAMAKRISHNAN, 2007; MWAI et al., 2012) e é caracterizado pela capacidade de uma subpopulação de bactérias, geneticamente susceptíveis a um determinado antimicrobiano, em sobreviver na presença deste (PHILIPS; ERNST, 2011). Adams e colaboradores (2011) ao estudar o fenômeno de tolerância em larvas de peixe-zebra infectadas com *Mycobacterium marinum* e em macrófagos infectados com *M. marinum* e *M. tuberculosis*, após tratamento com isoniazida, observaram que a tolerância à droga é induzida pela residência bacteriana em macrófagos e é mediada por distintas bombas de efluxo. Tais mecanismos podem ser relevantes para MCR. Por isso, seria importante o desenvolvimento de estudos para verificar se eles ocorrem nesses microrganismos e se estariam relacionados à disparidade entre a susceptibilidade *in vitro* e a resposta *in vivo* dos antimicrobianos.

A carência de correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e a resposta *in vivo*, observada no nosso estudo, também já foi relatada em humanos após tratamento com claritromicina. Kobashi e colaboradores (2011) descreveu um caso de uma mulher com furunculose na perna esquerda após a realização de depilação em um salão de beleza, no estado da Carolina do Norte (EUA). *Mycobacterium bolletii*/*M. massiliense* foi identificado como agente etiológico pelo sequenciamento dos genes *hsp65* e do RNA ribossomal 16S (rRNA). O tratamento com claritromicina foi iniciado, mas nenhuma melhora foi observada após 3 semanas. Como consequência, a claritromicina foi substituída pela associação de moxifloxacino e azitromicina. A terapia foi mantida por 6 meses com resolução completa das lesões. Em outro estudo, Wertman e colaboradores (2011) descreveu um caso peculiar em que *M. massiliense* foi isolado do sangue periférico e escarro de um paciente que estava recebendo tratamento imunossupressor para vasculite relacionada ao ANCA (anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos). O tratamento foi baseado na combinação de claritromicina, amicacina, imipenem/cilastatina e levofloxacina. No entanto, a resposta clínica não foi satisfatória e o paciente morreu 1 semana após o início da terapia. A concentração inibitória mínima para o isolado foi determinada e mostrou susceptibilidade apenas à claritromicina. No estudo realizado por Pôssa (2011), com

pacientes portadoras de infecções pós-cirúrgicas causadas por *M. abscessus*, a pesquisadora observou que apesar de todas apresentarem cura após o tratamento com claritromicina em combinação com amicacina, a evolução dessas pacientes não obedeceu a um padrão: das 14 pacientes estudadas, 14,2% foram assintomáticas antes de dar início ao tratamento e evoluíram com o aparecimento de novas lesões após o início do tratamento; 18,7% das pacientes evoluíram com melhora completa dos sintomas após início do tratamento e 62,5% evoluíram com o aparecimento de novas lesões durante o tratamento e mesmo após o término do tratamento e tiveram resolução espontânea sem intervenção médica.

Percebemos aqui, ao concluirmos esta dissertação, quão complexo é a relação entre a susceptibilidade *in vitro* e a resposta *in vivo* aos antimicrobianos por MCR. Embora, a evolução clínica de pacientes tratados ou não com esquema antimicrobiano específico esteja, em parte, de acordo com os resultados encontrados em nosso estudo, julgamos necessário maior aprofundamento e pesquisa deste assunto, sobretudo, para que esquemas de tratamento de pacientes infectados por MCR sejam estabelecidos com bases científicas sólidas.

## *Conclusões*

## 8. CONCLUSÕES

- 1) A claritromicina e a amicacina, isoladamente, não foram capazes de reduzir, dentro de um período de 14 dias, o número de bactérias no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com *M. massiliense*, nas concentrações de 50mg/kg/12h e 100mg/Kg/dia, respectivamente.
- 2) Apesar de não ter apresentado ação antimicrobiana, a claritromicina foi capaz de reduzir a evolução da hepatoesplenomegalia, bem como a formação de lesões granulomatosas no fígado de camundongos BALB/c infectados com *M. massiliense*.
- 3) Não houve correlação entres as atividades *in vitro* e *in vivo* da amicacina e da claritromicina contra *M. massiliense*.
- 4) Não houve o desenvolvimento de resistência da cepa de *M. massiliense* durante o tratamento de camundongos BALB/c com claritromicina e com amicacina por 14 dias.



## 9. PERSPECTIVAS

- 1) Determinar, por meio de bioensaio, as concentrações de amicacina e de claritromicina no soro, baço e fígado de camundongos BALB/c após administração das doses adotadas no presente estudo.
- 2) Avaliar a atividade combinada da claritromicina e amicacina contra *Mycobacterium massiliense in vitro* e em camundongos BALB/c.
- 3) Caracterização do perfil de citocinas no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com *M. massiliense*, após tratamento com claritromicina por 14 dias.

## *Referências*

## 10. REFERÊNCIAS

ADAMS, K. N.; TAKAKI, K.; CONNOLLY, L. E.; WIEDENHOFT, H.; WINGLEE, K.; HUMBERT, O.; EDELSTEIN, P. H.; COSMA, C. L.; RAMAKRISHNAN, L. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. **Cell**. 1;145(1):39-53. Apr.2011.

ADÉKAMBI, T.; REYNAUD-GAUBERT, M.; GREUB, G.; GEVAUDAN, M.J.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **J. Clin. Microbiol**, 42(12): 5493-550, Dec. 2004.

ALTENBURG, J.; DE GRAAFF, C. S.; VAN DER WERF, T. S.; BOERSMA, W. G. Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics - part 1: biological mechanisms. **Respiration**. 81(1):67-74. Aug. 2010.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculosis mycobacteria. **Am J Respir Crit Care Med**. 156 (2 Pt 2): S1–2, Aug. 1997.

ANVISA (Brasil). Infecção por *Mycobacterium abscessus* – Diagnóstico e Tratamento. Informativo Técnico Nº 1. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808\\_NotaTecnica\\_Micobacteria.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf)>. Acesso em: 19 set. 2010.

ANVISA (Brasil). Micobactérias – Nota Técnica. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808\\_NotaTecnica\\_Micobacteria.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf)>. Acesso em: 19 set. 2010.

ANVISA (Brasil). Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínicos, microbiológicos e tratamento. Nota Técnica Conjunta Nº 01/2009. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/nota\\_tecnica\\_conjunta.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/nota_tecnica_conjunta.pdf)>. Acesso em 27 de abril de 2011.

ARA, M.; DE SANTAMARIA, C. S.; ZABALLOS, P. YUS. C.; LEZCANO, M. A. *Mycobacterium chelonae* infection with multiple cutaneous lesions after treatment with acupuncture. **Int J Dermatol**. 42(8):642-64, Aug. 2003.

BANERJEE, S. K.; BHATT, K.; MISRA, P.; CHAKRABORTI, P. K. Involvement of a natural transport system in the process of efflux-mediated drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Mol. Gen. Genet**. 262(6):949–956, Jan. 2000.

BAKER, J. SCAIFE, H.; BROWN, M. R. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother**. 39(12):2684-8. Dec 1995.

BASTIAN, S.; VEZIRIS, N.; ROUX, A. L.; BROSSIER, F.; GAILLARD, J. L.; JARLIER, V.; CAMBAU, E. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rrl* sequencing. **Antimicrob Agents Chemother.** 55(2):775-81, Feb. 2011.

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annu Rev Biochem.** 64:29-63, Jul. 1995.

BRICKMAN, M.; PARSA, A. A.; PARSA, F. D. *Mycobacterium chelonae* infection after breast augmentation. **Aesthetic Plast Surg.** 29(2):116-8, Mar-Apr. 2005.

BRITISH THORACIC SOCIETY. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. **Thorax.** 55(3):210-218, Mar. 2000.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, J. R.; Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews,** 15 (4):716-746, Oct. 2002.

CARDOSO, A. M.; DE SOUSA, E. M.; VIANA-NIERO, C.; BONFIM DE BORTOLI, F. PEREIRA DAS NEVES, Z. C.; LEÃO, S. C.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes Infect,** 10(14-15):1552-7, Nov-Dec. 2008.

CELDRÁN, A.; ESTEBAN, J.; MAÑAS, J.; GRANIZO, J.J. Wound infections due to *Mycobacterium fortuitum* after polypropylene mesh inguinal hernia repair. **J Hosp Infect.** 66(4):374-7, Aug. 2007.

CHAMBER, H. F. Antimicrobianos: Os aminoglicosídeos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10. Ed. Rio de Janeiro: MacGraw Hill, 2005a. p. 913-923.

CHAMBER, H. F. Antimicrobianos: Inibidores da síntese proteica e antibacterianos diversos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10. Ed. Rio de Janeiro: MacGraw Hill, 2005b. p. 937-941.

CHAN, E. D.; BAI, X.; KARTALIJA, M.; ORME, I. O.; ORDWAY, D. J. Host immune response to rapidly growing mycobacteria, an emerging cause of chronic lung disease. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 43(4):387-93. Oct. 2010.

CHO, A.; KIM, Y. S.; KOOK, Y. H.; KIM, S. O.; BACK, S. J.; SEO, Y. J.; LEE, J. H.; LEE, Y. Identification of Cutaneous *Mycobacterium massiliense*- Infections Associated with Repeated Surgical Procedures. **Ann Dermatol.** 22(1):114–118. Feb. 2010.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.** CLSI document M100-S15 USA, v.25, n.1. 2005.

CLSI. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes**: Approved Standard. CLSI document - M24-A2. USA, v. 31, n. 5. 2011.

COHEN, Y.; PERRONNE, C.; LAZARD, T.; TRUFFOT-PERNOT, C.; GROSSET, J.; VILDE, J. L.; POCIDALO, J. J. Use of normal C57BL/6 mice with established *Mycobacterium avium* infections as an alternative model for evaluation of antibiotic activity. **Antimicrob Agents Chemother.** 39(3): 735-8, Mar. 1995.

CONNELL, N. D.; NIKAIDO, H. Membrane permeability and transport in *Mycobacterium tuberculosis*. In: BLOOM, B. R. (ed). Tuberculosis - Pathogenesis, Protection and Control. **American Society for Microbiology**. Washington, DC. 1994. p.333-352.

CONNOLLY, L.E.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Why is long-term therapy required to cure tuberculosis? **PLoS Med.** 4(3):e120. Mar. 2007.

DA COSTA CRUZ, J. C.; *Mycobacterium fortuitum* um novo bacilo acido-resistente patogênico para o homem. **Acta Med.** 1:297–301, 1938.

DE GROOTE, M. A.; HUITT, G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical infectious diseases**, 42(12): 1756–63, Jun. 2006.

DE MACEDO, J. S.; HENRIQUES, C. M. P. Infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido no Brasil. **Rev Bras Cir Plást.** 24(4): 544-551. 2009.

DE ROSSI, E.; AINSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiol Rev.** 30(1):36-52, Jan. 2006.

DUARTE, R. S.; LOURENÇO, M. C.; FONSECA, L. D. E. S.; LEÃO, S. C.; AMORIM, E. D. E. L.; ROCHA, I. L.; COELHO, F. S.; VIANA-NIERO, C.; GOMES, K. M.; DA SILVA, M. G.; LORENA, N. S.; PITOMBO, M. B.; FERREIRA, R. M.; GARCIA, M. H.; DE OLIVEIRA, G. P.; LUPI, O.; VILAÇA, B. R.; SERRADAS, L. R.; CHEBABO, A.; MARQUES, E. A.; TEIXEIRA, L. M.; DALCOLMO, M.; SENNA, S. G.; SAMPAIO, J. L. An Epidemic of Post-Surgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*. **J Clin Microbiol**, 47(7):2149-55, Jul. 2009.

ESTEBAN, J.; MARTÍN-DE-HIJAS, N. Z.; KINNARI, T. J.; AYALA, G.; FERNÁNDEZ-ROBLAS, R.; GADEA, I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiol.** 8:184, Oct. 2008.

EUZÉBY, J. P.; **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium***. 2011. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em: 07 jan. 2012.

FABRONI, C.; BUGGIANI, G.; LOTTI, T. Therapy of environmental mycobacterial infections. **Dermatol Ther.** 21(3): 162–166, May-Jun. 2008.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.** 9(2):177-215, Apr. 1996.

FERNANDES, P. B.; HARDY, D. J.; MCDANIEL, D.; HANSON, C. W.; SWANSON, R. N. *In vitro* and *in vivo* activities of clarithromycin against *Mycobacterium avium*. **Antimicrob Agents Chemother.** 33(9): 1531-4, Sep. 1989.

FRÉHEL, C.; OFFREDO, C.; DE CHASTELLIER, C. The phagosomal environment protects virulent *Mycobacterium avium* from killing and destruction by clarithromycin. **Infect Immun.** 65(7):2792-802. Jul. 1997.

FREITAS, D. L.; ALVARENGA, J.; SAMPAIO, M.; MANNIS, E.; SATO, L.; SOUSA, L.; VIEIRA, M. C.; YU, M. C.; MARTINS, A.; HOFFLING-LIMA, A.; BELFORT, J. R.; An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmology.** 110(2):276–285, Feb. 2003.

FURUYA, E.Y.; PAEZ, A.; SRINIVASAN, A.; COOKSEY, R.; AUGENBRAUN, M.; BARON, M.; BRUDNEY, K.; DELLA-LATTA, P.; ESTIVARZ, C.; FISCHER, S.; FLOOD, M.; KELLMER, C. R.; YAKRUS, M.; WEISS, D.; GRANOWITZ, E. V. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* wound infections among “lipotourists” from the United States who underwent abdominoplasty in the Dominican Republic. **Clin Infect Dis.** 46(8): 1181-8, Apr. 2008.

GANGADHARAM, P.R.; PERUMAL, V. K.; PODAPATI, N. R.; KESAVALU, L.; ISEMAN, M. D. *In vivo* activity of amikacin alone or in combination with clofazimine or rifabutin or both against acute experimental *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice. **Antimicrob Agents Chemother.** 32(9):1400-3. Sep. 1988.

GENTRY, C. A. Atypical Mycobacteria. In: SCHUMOCKV, G. T.; BRUNDAGE, D.; CHESSMAN, K.; DUNSWORTH, T.; FAGAN, S.; KELLY, W.; RATHBURN, R.; RICHIE, D.; SEMLA, T.; VASQUEZ, E.; ZAROWITZ, B. **Pharmacotherapy Self-Assessment Program – Infectious Diseases II.** 5ed. Kansa City: American College of Clinical Pharmacy. p 99-125, 2005.

GRAVANTE, G.; CARUSO, R.; ARACO, A.; CERVELLI, V. Infections after plastic procedures: incidences, etiologies, risk factors, and antibiotic prophylaxis. **Aesthetic Plast Surg.** 32(2):243-51, 2008.

GREENDYKE, R.; BYRD, T. F. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. **Antimicrob Agents Chemother.** 52(6):2019-26, Jun. 2008.

GRIFFITH, D. E.; GIRARD, W. M.; WALLACE JR, R. J. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: an analysis of 154 patients. **Am Rev Respir Dis.** 147(5):1271-8, May. 1993.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROW-ELLIOTT, B.; A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and

prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 175 (4): 367–416, Feb. 2007.

GUILLEMIN, I.; JARLIER, V.; CAMBAU, E. Correlation between Quinolone Susceptibility Patterns and Sequences in the A and B Subunits of DNA Gyrase in Mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**. 42(8):2084-8, Aug. 1998.

GUPTA, A. K.; CHAUHAN, D. S.; SRIVASTAVA, K.; DAS, R.; BATRA, S.; MITTAL, M.; GOSWAMI, P.; SINGHAL, N.; SHARMA, V. D.; VENKATESAN, K.; HASNAIN, S. E.; KATOCH, V. M. Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. **J Commun Dis**. 38(3): 246–54, Mar. 2006.

HAIIVY, J.; TOBIN, H. *Mycobacterium fortuitum* infection in prosthetic breast implants. **Plast Reconstr Surg**. 109(6):2124-8, May. 2002.

HARTMANS, S.; DE BONT, J. A. M.; STACKEBRANDT, E. The Genus *Mycobacterium*—Nonmedical. In: DWORKIN, M(ed). **The Prokaryotes**. Springer Science. New York, USA. 3:889–918, 2006.

HEISTEIN, J. B.; MANGINO, J. E.; RUBERG, R. L.; BERGESE, J. J. A prosthetic breast implant infected with *Mycobacterium fortuitum*. **Ann Plast Surg**. 44(3):330-3, Mar. 2000.

HINRICHSEN, S. L. *Micobactéria de crescimento rápido* - MRC. **Prática Hosp**. Ano IX. 53:106-111, Set-Out. 2007. Disponível em: <<http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2053/pdf/mat%2016.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2011.

IANARO, A.; IALENTI, A.; MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; ROMBOLÀ, L.; CARNUCCIO, R.; IUVONE, T.; D'ACQUISTO, F.; DI ROSA, M. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. **J Pharmacol Exp Ther**. 292 (1): 156-63, Jan. 2000.

JARAND, J.; LEVIN, A.; ZHANG, L.; HUITT, G.; MITCHELL, J. D.; DALEY, C. L.; Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. **Clin Infect Dis**. 52(5):565-71, Mar. 2011.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiol. Lett**. 123(1-2):11–18, Oct. 1994.

JEON, K.; KWON, O. J.; LEE, N. Y.; KIM, B. J.; KOOK, Y. H, LEE, S-H.; PARK, Y. K.; KIM, C. K.; KOH, W-J. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. **Am J Respir Crit Care Med**. 180(9):896-902, Nov. 2009.

JI, B.; LOUNIS, N.; TRUFFOT-PERNOT, C.; GROSSET, J. Effectiveness of various antimicrobial agents against *Mycobacterium avium* complex in the beige mouse mode. **Antimicrob Agents Chemother**. 38(11):2521-9. Nov. 1994.

JI, B.; LEFRANÇOIS, S.; ROBERT, J.; CHAUFFOUR, A.; TRUFFOT, C.; JARLIER, V. *In vitro* and *in vivo* activities of rifampin, streptomycin, amikacin, moxifloxacin, R207910, linezolid, and PA-824 against *Mycobacterium ulcerans*. **Antimicrob Agents Chemother.** 50(6):1921-6. Jun. 2006.

KANO, S.; RUBIN, B. K. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. **Clin Microbiol Rev.** 23(3):590-615, Jul. 2010.

KATOCH, V. M.; Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian J Med Res,** 120:290-304, Oct. 2004.

KENT, P. T.; KUBICA, G. P. **Public Health Mycobacteriology - A Guide for the Level III Laboratory.** U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control, Atlanta, GA. 1985. 207p.

KEVIN, L.; WINTHROP, M. D.; MARCY ABRAMS, R. N.; MITCHELL YAKRUS, M.S.; IRA SCHWARTZ, R. N.; JANET ELY, B. A.; DUNCAN GILLIES, B. A.; VUGIA, M.D. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. **N Engl J Med.** 346(18):1366-1371, May. 2002.

KIM, K. S.; BAYER, A. S. Significance of in-vitro penicillin tolerance in experimental enterococcal endocarditis. **J Antimicrob Chemother.** 19(4):475-85. Apr. 1987.

KIM, H-Y.; YUN, Y-J.; PARK, C.G.; LEE, D.H.; CHO, Y.K.; PARK, B. J.; JOO, S. I.; KIM, E. C.; HUR, Y. J.; KIM, B. J.; KOOK, Y-H. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. **J Clin Microbiol.** 45(9): 3127–3130, Sept. 2007.

KIM, H-Y.; KOOK, Y.; YUN, Y.J.; PARK, C.G.; LEE, N. Y.; SHIM, T. S.; KIM, B.J.; KOOK, Y-H. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* Group Isolates. **J Clin Microbiol.** 46(10):3384-90, Oct. 2008.

KLEIN, R.D.; EDBERG, S.C. Applications, significance of, and methods for the measurement of antimicrobial concentrations in human body fluids. In: LORIAN, V.; GEMMELL, C. G. **Antibiotics in laboratory medicine.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p.290-305.

KLEMENS, S. P.; CYNAMON, M. H. Activities of azithromycin and clarithromycin against nontuberculous mycobacteria in beige mice. **Antimicrob Agents Chemother.** 38(7):1455-9. Jul. 1994.

KOBASHI, Y.; MOURI, K.; OBASE, Y.; MIYASHITA, N.; NAKANAGA, K.; OKA, M. Pulmonary *Mycobacterium massiliense* disease with septicemia during immunosuppressive treatment. **Intern Med.** 50(9):1069-73, May. 2011.

KOHNO, Y.; OHNO, H.; MIYAZAKI, Y.; HIGASHIYAMA, Y.; YANAGIHARA, K.; HIRAKATA, Y.; FUKUSHIMA, K.; KOHNO, S. *In vitro* and *in vivo* activities of novel

fluoroquinolones alone and in combination with clarithromycin against clinically isolated *Mycobacterium avium* complex strains in Japan. **Antimicrob Agents Chemother.** 51(11):4071-6, Nov. 2007.

KOVALEVA, A.; REMMELTS, H. H.; RIJKERS, G. T.; HOEPELMAN, A. I.; BIESMA, D. H.; OOSTERHEERT, J. J. Immunomodulatory effects of macrolides during community-acquired pneumonia: a literature review. **J Antimicrob Chemother.** 67(3):530-40, Mar. 2012.

LAZARD, T.; PERRONNE, C.; GROSSET, J.; VILDE, J. L.; POCIDALO, J. J. Clarithromycin, minocycline, and rifabutin treatments before and after infection of C57BL/6 mice with *Mycobacterium avium*. **Antimicrob Agents Chemother.** 37(8): 1690-1692, Aug. 1993.

LEÃO, S. C.; MARTIN, A.; MEJIA, G. I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. **Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.** Vanden Broelle, Bruges, Belgium, 2004.

LEÃO, S. C.; GRINBAUM, R. S. Micobactérias não tuberculosas. In Veronesi, R; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia.** 4.ed. São Paulo: Atheneu. P. 1335-1343, 2009a.

LEÃO, S. C.; TORTOLI, E.; VIANA-NIERO, C.; UEKI, S. Y. M.; BATISTA LIMA, K. V.; LOPES, M. L.; YUBERO, J.; MENENDEZ, M. C.; GARCIA, M. J. 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(9): 2691–2698, Sep. 2009b.

LEÃO, S. C.; VIANA-NIERO, C.; MATSUMOTO, C. K.; LIMA, K.V.; LOPES, M.L.; PALACI, M.; HADAD, D.J.; VINHAS, S.; DUARTE, R. S.; LOURENÇO, M. C.; KIPNIS, A.; DAS NEVES, Z. C.; GABARDO, B. M.; RIBEIRO, M. O.; BAETHGEN, L.; DE ASSIS, D. B.; MADALOSSO, G.; CHIMARA, E.; DALCOLMO, M. P. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. **Future Microbiol.** 5(6):971-80, Jun. 2010.

LEÃO, S. C.; TORTOLI, E.; EUZÉBY, J. P.; GARCIA, M. J. Proposal that the two species *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov., and emendation of *Mycobacterium abscessus*. **Int J Syst Evol Microbiol.** 61(9):2311-3, Sept. 2011.

LOUNIS, N.; TRUFFOT-PERNOT, C.; GROSSET, J. Comparative activities of amikacin against *Mycobacterium avium* complex in nude and beige mice. **Antimicrob Agents Chemother.** 41(5): 1168–1169. May. 1997.

LOUNIS, N.; TRUFFOT-PERNOT, C.; BENTOUCHA, A.; ROBERT, J.; JI, B.; GROSSET, J. Efficacies of clarithromycin regimens against *Mycobacterium xenopi* in mice. **Antimicrob Agents Chemother.** 45(11): 3229-30, Nov. 2001.

MADSEN, C. T.; JAKOBSEN, L.; DOUTHWAITE.S. *Mycobacterium smegmatis* erm(38) is a reluctant dimethyltransferase. **Antimicrob Agents Chemother.** 49(9):3803–3809, Sep. 2005.

MARTÍNEZ, A.; TORELLO, S.; KOLTER, R. Sliding Motility in Mycobacteria. **J Bacteriol.** 181(23):7331-7338, Dec. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ocorrência de surto de infecções por micobactérias não tuberculosas pós-cirúrgicas no Rio de Janeiro/RJ. Nota Técnica N° 02 /DEVEP/SVS/MS, Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <[www.sobracilrj.com.br/micobacterias/Nota%20técnica%20MS.doc](http://www.sobracilrj.com.br/micobacterias/Nota%20técnica%20MS.doc)>. Acesso em: 25 de setembro de 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília, Ministério da Saúde, 1 ed. 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id\\_area=1133](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=1133)>. Acesso em: 21 de abril de 2011.

MONEGO, F. Caracterização molecular e análise da resistência a antimicrobianos em isolados de micobactérias de crescimento rápido coletados no Paraná. 2011. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

MONEGO, F.; DUARTE, R. S.; BIONDO, A. W. *gyrA* and *gyrB* Gene Mutation in Ciprofloxacin-Resistant *Mycobacterium massiliense* Clinical Isolates from Southern Brazil. **Microb Drug Resist.** 18(1):1-6, Feb. 2012.

MURILLO, J.; TORRES, J.; BOFILL, L.; RIOS-FABRA, A.; IRAUSQUIN, E.; ISTÚRIZ, R.; GUZMÁN, M.; CASTRO, J.; RUBINO, L.; CORDIDO, M. Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: an unexpected complication of liposuction and liposculpture. **Arch Dermatol.** 136(11):1347-52, Nov. 2000.

MWAI, L.; DIRIYE, A.; MASSENO, V.; MURIITHI, S.; FELTWELL, T.; MUSYOKI, J.; LEMIEUX, J.; FELLER, A.; MAIR, G. R.; MARSH, K. NEWBOLD, C.; NZILA, A.; CARRET, C. K. Genome wide adaptations of *Plasmodium falciparum* in response to lumefantrine selective drug pressure. **PLoS One.** 7(2):e31623. Feb. 2012.

NAKANAGA, K.; HOSHINO, Y.; ERA, Y.; MATSUMOTO, K.; KANAZAWA Y.; TOMITA, A.; FURUTA, M.; WASHIZU, M.; MAKINO, M.; ISHII, N. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a "hot spa" in Japan. **J Clin Microbiol.** 49 (2): 613-7, Feb. 2011.

NASH, K. A. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel *erm* gene, *erm(38)*. **Antimicrob Agents Chemother.** 47(10):3053-3060, Oct. 2003.

NASH, K. A.; ZHANG, Y.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE JR, R. J. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. **J. Antimicrob. Chemother.** 55(2):170-77, Feb. 2005.

NASH, K. A.; ANDINI, N.; ZHANG, Y.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE JR, R. J. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50(10): 3476-3478, Oct. 2006.

NASH, K. A.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE JR. R. J. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrob Agents Chemother.** 53(4):1367-76, Apr. 2009.

NCCLS. **Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes**; approved standard. NCCLS document M24-A. USA, v. 23, n. 18, 2003a.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. USA, v.23, n. 02, 2003b.

NESSAR, R.; REYRAT, J. M.; MURRAY, A.; GICQUEL, B. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. **J Antimicrob Chemother.** 66(8):1719-24, Aug. 2011.

NEWMAN, M. I.; CAMBEROS, A. E.; ASCHERMAN, J. *Mycobacteria abscessus* outbreak in US patients linked to offshore surgicenter. **Ann Plast Surg.** 55(1):107-10, 2005.

ORTÍZ-PÉREZ, A.; MARTÍN-DE-HIJAS, N.; ALONSO-RODRIGUEZ, N.; MOLINA-MANSO, D.; FERNÁNDEZ-ROBLAS, R.; ESTEBAN, J. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 29(2):79-84, Feb. 2011.

OSUGUI, S. K. Infecções cutâneas causadas por micobactérias de crescimento rápido. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA - Simpósio de Micobactérias, 2001, Foz do Iguaçu, PR [**Resumo S-066**], Oct. 2001. p. 21-25.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M.; FREIRE, M. P.; BRANDÃO DE ASSIS, D.; MADALOSSO, G.; PELLINI, A. C.; CÉSAR M. L.; PISANI NETO, V.; BELTRAMELLI, M. M.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; DA SILVA TELLES, M. A.; SAMPAIO, J. L.; LEÃO, S.C. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **J Hosp Infect.** 67(2):161-7, Oct. 2007.

PETERSEN, E. A.; GRAYSON, J. B.; HERSH, E. M.; DORR, R. T.; CHIANG, S. M.; OKA, M.; PROFFITT, R. T. Liposomal amikacin: improved treatment of *Mycobacterium avium* complex infection in the beige mouse model. **J Antimicrob Chemother.** 38(5):819-28. Nov. 1996.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Directly observing therapy: a new view of drug tolerance in tuberculosis. **Cell**. 1;145(1):13-4. Apr. 2011.

PINHEIRO, C. M. L.; Perfil de sensibilidade a antimicrobianos e análise genotípica de cepas de micobactérias de crescimento rápido envolvidas em surtos e infecções esporádicas no Brasil. 2009. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2009;

PÔSSA, T. A. L. Infecções de pele e partes moles causadas por *Mycobacterium abscessus* após procedimentos cirúrgicos estéticos: Análise de aspectos clínicos, terapêuticos e microbiológicos. 2011. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2011.

PRAMMANANAN, T.; SANDER, P.; BROWN, B. A.; FRISCHKORN, K.; ONYI, G. O.; ZHANG, Y.; BÖTTGER, E. C.; WALLACE JR, R. J. A Single 16S Ribosomal RNA Substitution Is Responsible for Resistance to Amikacin and Other 2-Deoxystreptamine Aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. **J Infect Dis**. 177(6):1573-81. Jun. 1998.

PRIMM, T. P.; LUCERO, C. A.; FALKINHAM, J. O. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin Microbiol Rev**. 17(1): 98–106, Jan. 2004.

REVEL, V.; CAMBAU, E.; JARLIER, V.; SOUGAKOFF, W. Characterization of mutations in *Mycobacterium smegmatis* involved in resistance to fluoroquinolones. **Antimicrob Agents Chemother**. 38(9):1991-6. Sep. 1994.

REYES, N.; SKINNER, R.; BENTON, B. M.; KRAUSE, K. M.; SHELTON, J.; OBEDENCIO, G. P.; HEGDE, S. S. Efficacy of telavancin in a murine model of bacteraemia induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**. 58(2):462-5. Aug. 2006.

RODRIGUES, L.; WAGNER, D.; VIVEIROS, M.; SAMPAIO, D.; COUTO, I.; VAVRA, M.; KERN, W. V.; AMARAL, L. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. **J Antimicrob Chemother**. 61(5):1076-82, May. 2008.

SAITO, H.; TAsAKA, H. Comparison of the Pathogenicity for mice of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus*. **J. Bacteriol**. 99(3):851-855, Sep. 1969.

SAITO, H.; TOMIOKA, H.; SATO, K.; DEKIO, S. *In vitro* and *in vivo* antimycobacterial activities of a new quinolone, DU-6859a. **Antimicrob Agents Chemother**. 38(12):2877-82, Dec. 1994.

SAMPAIO, J. L.; CHIMARA, L.; FERRAZOLI, M. A.; DA SILVA TELES, V. M.; DEL GUERCIO, Z. V.; JERICO, K.; MIYASHIRO, C. M.; FORTALEZA, M. C.; PADOVEZES M. C.; LEO, S. C. Application of four molecular typing methods for

analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. **Clin Microbiol Infect.** 12(2):142-9, Feb. 2006a.

SAMPAIO, J. L.; VIANA-NIERO, C. DE FREITAS, D.; HÖFLING-LIMA, A. L.; MIYASHIRO, C. M.; ALBERTO, F. L.; LEAO, S. C. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 55(2):107-18, Jun. 2006b.

SAMPAIO, J. L.; JUNIOR, D. N.; DE FREITAS, D.; HÖFLING-LIMA, A. L.; LEAO, S. C. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. **J Clin Microbiol.** 44(9): 3201-7, Sep. 2006c.

SEABRA, F.P.; ROZENBERG, I.; ANDRADE, M.; AZAMBUJA, D. Ceratite pelo *Mycobacterium chelonae* após laser in situ ceratomileusis (lasik). Estudo microbiológico e histopatológico: relato de um caso-P018. **Resumo dos painéis do XXXI Congresso de Oftalmologia.** 2002. Disponível em: <<http://www.abonet.com.Br/abo/644s/painel01.htm>> Acesso em: 27 abr. 2011.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica CVE/SES-SP. Divisão de Controle da Tuberculose. 2005. Disponível em: <[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/tb/MNT\\_Final\\_9-12-05a.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf)>. Acesso em: 28 jan. 2010.

SNIEZEK, P. J.; GRAHAM, B. S.; BUSCH, H. B.; LEDERMAN, E. R.; LIM, M. L.; POGGEMER, K.; KAO, A.; MIZRAHI, M.; WASHABAUGH, G.; YAKRUS, M.; WINTHROP, K. Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. **Arch Dermatol.** 139(5):629-634, May. 2003.

SONG, J. Y.; SOHN, J. W.; JEONG, H. W.; CHEONG, H. J.; KIM, W. J.; KIM, M. J. An outbreak of post-acupuncture cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus*. **BMC Infect Dis.** 6: 6, Jan. 2006.

SOUSA, E. M.; Avaliação da Resposta Imunológica Aguda de Camundongos C57BL/6 e BALB/c Frente à Infecção por *Mycobacterium massiliense*. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade de Goiás, Goiânia. 2009.

STAHL, D. A.; URBANCE, J. W. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. **J bacteriolo.** 172(1): 116-124, Jan. 1990.

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

SWENSON, J. M.; WALLACE JR, R. J.; SILCOX, V. A.; THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility of five subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. **J. Antimicrob. Chemother.** 28(6): 807-811, Dec. 1985.

TANAKA, S.; ITOHARA, S.; SATO, M.; TANIGUSHI, T. YOKOMIZO, Y. Reduced formation of granulomata in gamma(delta) T cell knockout BALB/c mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Vet Pathol.** 37(5):415-21. Sep. 2000.

TENG, R.; DICK, T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. **FEMS Microbiol Lett.** 227:171–4, Oct. 2003.

TIWARI, T. S.; B. RAY, K. C.; JOST, JR. M. K.; RATHOD, Y.; ZHANG, B. A.; BROWN-ELLIOTT, K.; HENDRICKS, A. R. J.; WALLACE, JR. R. J. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. **Clin. Infect. Dis.** 36(8):954–962, Apr. 2003.

VAEREWIJCK, M. J. M.; HUYS, G.; PALOMINO, J. C.; SWINGS, J. PORTAELS, F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **FEMS Microbiol Rev.** 29(5):911-34, Nov. 2005.

VAN INGEN, J.; DE ZWAAN, R.; DEKHUIJZEN, R. P.; BOEREE, M. J.; VAN SOOLINGEN, D. Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae-abscessus* group isolation in 95 patients. **J Infect.** 59(5):324-331, Nov. 2009.

VIANA-NIERO, C.; LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; RABELLO, M. C. S.; MARSOLA, L. R.; BRILHANTE, V. C. R.; DURHAM, A. M.; LEÃO, S. C. 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(3): 850–855, Mar. 2008.

VILLANUEVA, A.; CALDERON, R. V.; VARGAS, B. A.; RUIZ, F. AGUERO, S.; ZHANG, Y.; BROWN, B. A.; WALLACE, JR. R. J.; Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis.** 24(6):1147–53, Jun. 1997.

VRIONI, G.; NAUCIEL, C.; KERHARO, G.; MATSIOTA-BERNARD, P. Treatment of disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a murine model with ciprofloxacin, amikacin, ethambutol, clarithromycin and rifabutin. **J Antimicrob Chemother.** 42(4): 483-7, Oct. 1998.

WALLACE JR, R. J.; MEIER, A.; BROWN, B. A.; ZHANG, Y.; SANDER, P.; ONYI, G. O.; BÖTTGER, E. C. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrob Agents Chemother.** 40(7):1676–1681, Jul. 1996.

WALLIS, R. S.; PATIL, P.; CHEON, S-H.; EDMONDS, K.; PHILLIPS, M.; PERKINS, M. D.; JOLOBA, M.; NAMALE, A. JOHNSON, J. L.; TEIXEIRA, L.; DIETZE, R.; SIDDIQI, S.; MUGERWA, R. D.; EISENACH, K.; ELLNER, J. J. Drug Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother.** 43(11): 2600–2606. Nov. 1999.

WARNER, D. F.; MIZHARI, V. Tuberculosis Chemotherapy: the Influence of Bacillary Stress and Damage Response Pathways on Drug Efficacy. **Clin. Microbiol. Rev.** 19(3)558-570. Jul. 2006.

WERTMAN, R.; MILLER, M.; GROBEN, P.; MORRELL, D. S.; CULTON, D. A. *Mycobacterium bolletii*/*Mycobacterium massiliense* - furunculosis associated with pedicure footbaths: a report of 3 cases. **Arch Dermatol.** 147(4):454-8, Apr. 2011.

WINTHROP, K. L.; ABRAMS, M.; YAKRUS, M.; SCHWARTZ, I.; ELY, J.; GILLIES, D.; VUGIA, D. J. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. **N Engl J Med**, 346(18): 1366–71, May. 2002.

WOODS, G. L.; BERGMANN, J. S.; WITEBSKY, F. G. ; FAHLE, G. A.; BOULET, B.; PLAUNT, M.; BROWN, B. A.; WALLACE JR, R. J. WANGER, A. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. **J Clin Microbiol.** 38(2):656-61, Feb. 2000.

YANAGIHARA, K.; MORINAGA, Y.; NAKAMURA, S.; SEKI, M.; IZUMIKAWA, K.; KAKEYA, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S.; KOHNO, S. Subinhibitory concentrations of telithromycin, clarithromycin and azithromycin reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase *in vitro* and *in vivo*. **J. Antimicrob. Chemother.** 61(3): 647-50, Mar. 2008.