



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



EFLUXO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO COMPLEXO
Mycobacterium avium

Michael Andrés Abril Gómez

Rio Grande, 2021



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



EFLUXO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO COMPLEXO
Mycobacterium avium

Michael Andrés Abril Gómez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva

Co-orientadora: Prof.^a. Dra. Júlia Silveira Vianna

Rio Grande, 2021

Michael Andrés Abril Gómez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

EFLUXO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO COMPLEXO
Mycobacterium avium

Banca Examinadora

Prof.^ª Dra. Luciana de Souza Nunes (Externo) – UNIPAMPA

Prof.^ª Dra. Maria Lúcia Rossetti (Externo) - ULBRA

Prof.^ª Dra. Ivy Bastos Ramis de Souza – FURG

Prof.^ª Dra. Katheryne Benini Martins (Suplente) – FURG

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva

Co-orientadora: Prof.^ª Dra. Júlia Silveira Vianna

Rio Grande, 2021

AGRADECIMENTOS

Ao final desta dissertação de mestrado, é impossível não olhar para trás e entender que este processo não teria sido possível sem o apoio, compromisso e dedicação das pessoas e instituições que dele participaram. Agradeço de modo especial à Universidade Federal do Rio Grande, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela oportunidade de ter feito parte do curso de Pós-Graduação e pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros do Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM), professores e colegas, pelo apoio acadêmico, ensinamentos pessoais e sincera amizade.

Ao Professor Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva, orientador desta dissertação, por ter depositado sua confiança em mim, pela dedicação e empenho para levar adiante este projeto especialmente, pelo exemplo.

À professora Dra. Júlia Silveira Vianna, co-orientadora desta dissertação, por me acompanhar, e ter trabalhando lado a lado, em cada momento deste processo.

Aos meus amigos, por cada experiência que vivemos juntos, cada sorriso e cada abraço. Vocês foram uma pequena família que construí no Sul do Brasil e que levarei comigo para sempre.

À minha família, que mesmo a distância esteve sempre presente me apoiando para ser melhor a cada dia. Os gestos de carinho e as palavras de incentivo recebidas de vocês, me levaram a conquistar os meus sonhos.

A cada pessoa que caminhou ao meu lado, e me deu seu apoio, carinho e inspiração, muito obrigado!

“Os cientistas dizem que somos feitos de átomos, mas um passarinho me contou que somos feitos de histórias”.

Eduardo Galeano.

RESUMO

Micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* (CMA) são responsáveis por diversas infecções, principalmente pulmonares. Mundialmente distribuído, membros do CMA apresentam altas taxas de resistência aos antimicrobianos (ATM) considerados eficazes para o tratamento destas infecções. Mutações em genes que codificam alvos de ação dos ATM estão frequentemente relacionadas a resistência. Além disso, o mecanismo de efluxo também pode estar envolvido com os fenótipos resistentes aos ATM. Neste sentido, esta dissertação tem como objetivo estudar a relação entre o mecanismo de efluxo e a resistência aos ATM, em espécies do CMA, além de avaliar potenciais compostos inibidores de bombas de efluxo (IE), que possam atuar como moduladores da resistência antimicrobiana nessas espécies. Para isto, foram incluídas onze cepas de CMA de origem pulmonar, cinco identificadas como *M. avium* e seis como *M. intracellulare*. A partir da determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos ATM, claritromicina (CLA), rifampicina (RIF), amicacina (AMI) e etambutol (EMB), encontramos que 36% (4/11) das cepas avaliadas apresentaram resistência a pelo menos um dos ATM testados, neste sentido, a análise de mutações relacionadas a resistência a CLA, mostrou que 90% (10/11) das cepas avaliadas tinha uma sequência do gene 23S rRNA conservada e, uma única cepa, com alto nível de resistência fenotípica a CLA, apresentou mutação pontual na posição 2058 (A→T). A CMI dos candidatos a IE, verapamil (VP), tioridazina (TZ), ácido úsnico (AUS) e o derivado de tetrahidropiridina NUNL2, também foi determinada, e a interação entre os ATM e os IE foi avaliada por ensaios modulatórios, nos quais destacou-se uma atividade significativa do AUS e do NUNL2 na redução da CMI dos ATM, frente as cepas de CMA com fenótipo de resistência. A fim de confirmar a presença da atividade do efluxo, foram realizados ensaios fluorimétricos de acumulação de brometo de etídio. Tanto os IE clássicos, quanto o AUS e o NUNL2 mostraram atividade como IE frente as quatro cepas avaliadas. Cabe destacar que os novos compostos testados, AUS e NUNL2, também apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as onze cepas do CMA testadas. Estes resultados permitem inferir que o mecanismo de efluxo possa estar relacionado com a resistência aos ATM em cepas do CMA, e desta forma, os IE podem ser uma estratégia para o tratamento de infecções com estas micobactérias.

Palavras-chave: Micobactérias não tuberculosas, complexo *Mycobacterium avim*, mecanismo de resistência, bombas de efluxo, ensaio de acumulação.

ABSTRACT

Mycobacterium avium complex (MAC) mycobacteria are responsible for several infections, mainly pulmonary. Worldwide distributed, MAC members present high rates of resistance to antimicrobials (ATM) usually used for the treatment of these infections. Mutations in genes encoding ATM action targets are often related to this resistance. Furthermore, the efflux mechanism may also be involved with ATM resistant phenotypes. This dissertation aims to study the relationship between efflux mechanism and ATM resistance in MAC species and to evaluate potential efflux pump inhibitor compounds (EPI), which can act as modulators of antimicrobial resistance. Eleven MAC strains, from pulmonary samples, were included. Among these samples, five were identified as *M. avium* and six as *M. intracellulare*. In tests evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) of clarithromycin (CLA), rifampicin (RIF), amikacin (AMI) and ethambutol (EMB), against MAC strains, we found that 36% (4/11) of the strains were resistant to at least one ATM. The MIC of EPI candidates, verapamil (VP), thioridazine (TZ), usnic acid (AUS) and the tetrahydropyridine derivative NUNL2, was also determined. The interaction between ATM and EPI, evaluated by modulatory assays, highlighted the AUS and NUNL2 activity in reducing ATM MIC against MAC resistant strains. In order to confirm the presence of efflux activity in MAC strains, fluorometric assays, using ethidium bromide accumulation, were performed. Both classic EPI, AUS and NUNL2, showed activity as EPI against the four evaluated strains. Both AUS and NUNL2 compounds also showed antimicrobial activity against all tested MAC strains. In the analysis of mutations related to CLA, 90% (10/11) of the resistant strains had a conserved 23S rRNA gene sequence. One strain presented high level of resistance to CLA and showed a point mutation at position 2058 (A→T) of this gene. These results allow us to infer that the efflux mechanism is related to resistance to ATM in MAC strains, and thus, EPI can be an alternative for the treatment of MAC infections.

Keywords: Non-tuberculous mycobacteria, *Mycobacterium avium* complex, resistance mechanism, efflux pumps, accumulation assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das micobactérias	21
Figura 2. Acumulação de brometo de etídio em diferentes concentrações frente as cepas do complexo <i>Mycobacterium avium</i> .	83
Figura 3. Efeito dos inibidores de efluxo na acumulação de brometo de etídio (0,5 µg/mL) frente as cepas do complexo <i>Mycobacterium avium</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Membros do complexo <i>Mycobacterium avium</i> atualmente reconhecidos	22
Tabela 2. <i>Primers</i> usados na identificação de espécies	65
Tabela 3. Concentração dos reagentes usados na PCR	65
Tabela 4. Condições da PCR para ITS, DT1 e DT6	66
Tabela 5. Pontos de corte dos antimicrobianos (mg/mL)	68
Tabela 6. <i>Primers</i> usados na avaliação de resistência	74
Tabela 7. Concentrações da PCR para o gene 23S rRNA	74
Tabela 8. Condições da PCR para o gene 23S rRNA	74
Tabela 9. Preparo das amostras enviadas para sequenciamento de DNA	76
Tabela 10. Características das cepas avaliadas	79
Tabela 11. Concentração Mínima Inibitória dos Antimicrobianos, Inibidores de Efluxo e Brometo de Etídeo frente as cepas avaliadas	80
Tabela 12. Interação entre os inibidores de efluxo e a antimicrobianos frente a cepas do complexo <i>Mycobacterium avium</i> .	82
Tabela 13. Valores da Fluorescência Final Relativa obtidas nos ensaios de acumulação	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
AMI	Amicacina
ATM	Antimicrobiano
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
AUS	Ácido Úsnico
BAAR	Bacilos Ácido-Álcool Resistentes
BrEt	Brometo de Etídeo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEPAS	Comitê De Ética em Pesquisa na Área da Saúde
CLA	Claritromicina
CLSI	<i>Clinical And Laboratory Standards Institute</i>
CMA	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPZ	Clorpromazina
DP-MNT	Doença Pulmonar por Micobactérias Não Tuberculosas
DP-CMA	Doença Pulmonar pelo Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
EMB	Etambutol
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FC	Fibrose cística
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFR	Fluorescência Final Relativa
IDSA	<i>Infectious Disease Society of America</i>
IE	Inibidores de Efluxo
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MDR	Multidroga Resistente
MFS	<i>Major Facilitator Super Family</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RIF	Rifampicina
RND	<i>Resistance-Nodulation-Division</i>
RP	Reserpina
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TZ	Tioridazina
VP	Verapamil

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	Graus celsius
B	Beta
½	Metade
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
<	Menor
=	Igual
+	Soma
±	Mais ou menos
µL	Microlitros
µM	Micrômetro
C1	Concentração de estoque
C2	Concentração de uso
g	Gramas
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
Nº	Número
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
Nmol	Nanomolar
pH	Potencial hidrogeniônico
Pmol	Picomol
U	Unidades
V	Voltz
V1	Volume inicial
V2	Volume final
X	Vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. O gênero <i>Mycobacterium</i> , as micobactérias não tuberculosas e o complexo <i>Mycobacterium avium</i>	20
2.2. Manifestações clínicas	23
2.2.1. Infecções pulmonares	23
2.2.2. Infecções extrapulmonares	26
2.3. Epidemiologia do complexo <i>Mycobacterium avium</i>	28
2.4. Fatores de risco	33
2.5. Transmissão	35
2.6. Patogenia	37
2.7. Diagnóstico	40
2.8. Tratamento	45
2.9. Resistência aos antimicrobianos	53
3. HIPÓTESES	60
4. JUSTIFICATIVA	61
5. OBJETIVOS	62
5.1. Objetivo geral	62
5.2. Objetivos específicos	62
6. MATERIAIS E MÉTODOS	63
6.1. Delineamento do estudo	63
6.2. Cultivo bacteriano	63
6.3. Atividades experimentais para a identificação das espécies do complexo <i>Mycobacterium avium</i>	64
6.3.1. Extração de DNA por inativação	64
6.3.2. Amplificação por PCR	64
6.4. Determinação da concentração mínima inibitória	66
6.5. Fator modulatório dos inibidores de efluxo na atividade antimicrobiana	68
6.6. Avaliação da acumulação do Brometo de etídio	70
6.7. Identificação de mutações relacionadas a resistência antimicrobiana	72
6.7.1. Extração de DNA pelo método CTAB/NaCl	72
6.7.2. Sequenciamento	75
6.7.2.1. Purificação de DNA	75
6.7.2.2. Quantificação de DNA	75
6.7.2.3. Preparação final das amostras	75
6.7.2.4. Análise dos resultados do sequenciamento	76
7. ASPECTOS ÉTICOS	77
8. RESULTADOS	78
8.1. Identificação da espécie	78
8.2. Concentração mínima inibitória de antimicrobianos e inibidores de efluxo	79

8.3. Ensaio modulatorio	81
8.4. Ensaio de acumulacao de brometo de etidio	82
8.5. Mutacoes relacionadas com a resistencia a claritromicina	86
9. DISCUSSAO	87
10. CONCLUSAO	94
REFERENCIAS	95
APENDICE A. Trabalhos complementares	147

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias não tuberculosas (MNT) são um grupo de patógenos oportunistas, causadores de diversas doenças. Entre estas, os membros do complexo *Mycobacterium avium* (CMA), especialmente as espécies *M. avium* e *M. intracellulare*, são os agentes causadores de doença pulmonar por MNT (DP-MNT) mais prevalentes, e essa tendência parece continuar aumentando (SHAH, 2016; LOPEZ-LUIS, 2020; DALEY, 2020; GOPALASWAMY, 2020). Outras formas de apresentação das infecções relacionadas ao CMA são linfadenite e doença disseminada, comumente associada a pacientes com sistema imunológico comprometido (PIERSIMONI, 2009; FERREIRA, 2010; DALEY, 2017).

Os pacientes com DP-CMA têm um risco significativo de morte, isto foi observado em uma revisão sistemática recente que incluiu 9.035 pacientes, na qual se investigou a mortalidade ao longo prazo em pacientes com DP-CMA. A maioria dos estudos documentou uma estimativa de mortalidade em cinco anos superior ao 25%, este valor se mostrou independente da heterogeneidade nas características, como sexo masculino, presença de doença cavitária e altos níveis de comorbidades, predizendo piores resultados de sobrevivência (DIEL, 2018). Esses achados são preocupantes, e devem alertar as autoridades de saúde pública, para a vigilância e controle desta doença, por meio de um manejo mais eficaz e coleta adicional de dados prospectivos de mortalidade.

A DP-CMA caracteriza-se também pela dificuldade do seu tratamento (DALEY, 2017; PAN, 2020), o que pode estar relacionado, entre outras coisas, a fatores ambientais, fatores de virulência do microrganismo, e susceptibilidade do hospedeiro (NOVOSAD, 2015; LANDE, 2018; COWMAN, 2019). Nos últimos anos, tem-se relatado altas taxas de resistência dos membros do CMA aos diferentes antimicrobianos (ATM) usados no seu tratamento (UCHIYA, 2017; PARK, 2019). Em vista disso, o CMA se torna um importante foco de pesquisa e vigilância em saúde pública.

A resistência dos membros do CMA aos ATM começou a ser relatada na década de 1990, apenas alguns anos após ter sido estabelecido a monoterapia com macrolídeos, como o principal grupo de ATM no tratamento destas doenças (DAUTZENBERG, 1991; RUF, 1992; WALLACE, 1996). No entanto, hoje em dia são usados esquemas de tratamento combinados com etambutol (EMB), rifampicina (RIF) e, em alguns casos,

combina-se também um aminoglicosídeo, como a amicacina (AMI) (GRIFFITH, 2018). O intuito do uso desses esquemas é evitar o surgimento de cepas resistentes ou multidroga resistentes (MDR) (MITCHISON, 2012; WORTHINGTON, 2013), porém, alguns desses ATM apresentam um alto nível de toxicidade e diversos efeitos colaterais, o que somado aos longos períodos de tratamento, agrava ainda mais o quadro clínico dos pacientes (GRIFFITH, 2005; KAMII, 2018; VAN INGEN, 2020; ITO, 2020)

O desenvolvimento de resistência aos ATM pelos membros do CMA pode surgir como consequência de fatores intrínsecos e adquiridos, relacionados a composição da parede celular micobacteriana, a presença de enzimas modificadoras de ATM (KOH, 2013), a presença de proteínas de transporte, como porinas, que facilitam o acesso dos ATM (PHILALAY, 2004; NASIRI, 2017; LUTHRA, 2018), mutações nos sítios alvo (MEIER, 1994; JAMAL, 2000; OBATA, 2006; PARK, 2020) e, a presença de bombas de efluxo, as quais permitem a extrusão de diferentes substâncias do interior da célula (SCHMALSTIEG, 2012; KOURTESI, 2013; MENICHINI, 2020; RINDI, 2020).

Diversos estudos experimentais têm mostrado que o aumento do efluxo permite a extrusão de diferentes tipos de ATM, facilitando a sobrevivência do patógeno em um ambiente com concentrações de ATM sub-letais, o que contribui na geração de microrganismos multidrogas resistentes (MDR) (ROSSI, 2006; LI, 2009; RODRIGUES, 2009, SCHMALSTIEG, 2012; ASHIMA, 2012; MENICHINI, 2020; RINDI, 2020; PARKER, 2020). As bombas de efluxo, não apenas podem expelir uma ampla gama de ATM, mas também facilitam a aquisição de mecanismos de resistência adicionais, uma vez que ao reduzir a concentração intracelular de ATM, promove a expressão de mutações nos sítios alvo dos mesmos (PIDDOCK, 2006; DELMAR, 2014; CHITSAZ, 2017). Schmalstieg *et. al.*, (2012) sugere que a expressão de bombas de efluxo poderia ser a primeira etapa no desenvolvimento de altos níveis de resistência aos ATM em micobactérias (SCHMALSTIEG, 2012).

Nos membros do CMA tem sido descrito a presença de bombas de efluxo pertencentes às diferentes famílias de transportadores associados com a resistência a claritromicina (CLA), azitromicina, clofamicina (RODRIGUES, 2009; SCHMALSTIEG, 2012; MACHADO, 2015) e mais recentemente a bedaquilina (ALEXANDER, 2017), um fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2012 para ser usado no tratamento da tuberculosis MDR.

Em soma, considerando o papel do efluxo na aquisição de resistência nos membros do CMA, a inibição desse mecanismo surge como uma importante estratégia, que poderia auxiliar no combate destes patógenos, por isto, o desenvolvimento de inibidores de bombas de efluxo (IE) torna-se fundamental (BAMBEKE, 2006; RODRIGUES, 2011; Da SILVA, 2011; PULE, 2016; GONZÁLEZ-BELLO, 2017; RODRIGUES, 2020).

O uso combinado de IE e ATM em ensaios experimentais *in vitro* com micobactérias, como *M. tuberculosis*, *M. fortuitum* ou membros do complexo *M. abscessus* (CMABS), tem mostrado que cepas com altos níveis de resistência aos ATM, tornam-se sensíveis após alguns dias de incubação (RODRIGUES, 2009; BALGANESH, 2012; MACHADO, 2015; VIANNA, 2019; AMARAL, 2020). No entanto, o caminho para o seu uso na prática clínica ainda apresenta dificuldades, principalmente devido ao fato de que as altas concentrações dos IE clássicos, como o verapamil (VP), que seriam necessárias para o seu uso *in vivo* apresentam toxicidade (KOURTESI, 2013; MAHMOOD, 2016; RODRIGUES, 2020). Estes desafios tornam-se uma oportunidade na pesquisa em ciência básica para o desenvolvimento de IE menos tóxicos, e que em uma menor concentração, possam ser utilizados na prática clínica.

Neste sentido, o Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM), tem avançado no uso de IE derivados de compostos naturais, como o ácido úsnico (AUS), um composto derivado de líquens e que também tem mostrado papel ATM em diferentes microrganismos, incluindo micobactérias (RAMOS, 2010; RAMIS, 2018). Da mesma forma, o NUPEMM também vem trabalhando na utilização de compostos semissintéticos como IE, um exemplo disto é a utilização de derivados de tetrahidropiridinas, como o NUNL2 (Da SILVA, 2017; VIANNA, 2019).

Na procura de ampliar os conhecimentos existentes sobre a relação entre o mecanismo de efluxo e a resistência a ATM em membros do CMA, esta dissertação teve por objetivo avaliar de maneira experimental, a relação entre a inibição de bombas de efluxo e a resistência aos ATM, em cepas do CMA de origem pulmonar. Além disso, buscou avaliar dois IE distintos dos IE clássicos, como uma estratégia terapêutica no desenvolvimento de adjuvantes no tratamento destas infecções.

Esta dissertação iniciará com a apresentação de uma revisão bibliográfica, discutindo aspectos gerais relacionados aos membros do CMA e as principais infecções

causadas por estas micobactérias, especialmente as DP-CMA, bem como os métodos utilizados para o diagnóstico, o tratamento disponível e os mecanismos de resistência aos ATB mais comumente utilizados. Logo, serão apresentados as hipóteses e objetivos do estudo, além de uma justificativa para a escolha do tema proposto e, a seguir, será descrita a metodologia utilizada, os resultados obtidos e uma discussão a respeito do papel do mecanismo de efluxo nas cepas pertencentes ao CMA estudadas. Por fim, serão apresentadas as atividades complementares realizadas durante o período de mestrado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. O gênero *Mycobacterium*, as Micobactérias Não Tuberculosas e o Complexo *Mycobacterium avium*

As micobactérias são bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), imóveis e não esporulados, pertencem ao gênero monofilético *Mycobacterium*, da ordem *Actinomycetales*. Se caracterizam pela presença de ácidos micólicos complexos de cadeia longa na parede celular (60–90 carbonos) e o alto teor de Guanina + Citocina (G+C) (57–73%) no seu DNA (ALDERWICK, 2015; VINCENT, 2018). Atualmente, cerca de 200 espécies compõem esse grupo (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>), sendo a maioria delas, micobactérias não tuberculosas (MNT), ou seja, outras espécies diferentes do *M. leprae*, *M. lepromatosis*, *M. ulcerans* e membros complexo *M. tuberculosis* (CMTB) (FORBES, 2017; ABRAHAMS, 2018; GUPTA, 2018; TORTOLI, 2019).

As MNT se caracterizam por estar amplamente distribuídas no meio ambiente, são considerados microrganismos ubíquos, podendo estarem presentes na água, alimentos e solo, também têm a capacidade de se adaptar e sobreviver em condições adversas, incluindo a privação de nutrientes e hipóxia (COOK, 2010; HONDA, 2018; PEREIRA, 2020). O primeiro sistema de classificação fenotípico das MNT é atribuído a Ernest Runyon, que classificou as MNT em quatro grupos, diferenciado pelo tempo de crescimento e produção de pigmentos carotenoides no meio de cultura. As micobactérias de crescimento lento, formam colônias em meios sólidos em ≥ 7 dias, enquanto as micobactérias de rápido crescimento formam colônias em ≤ 7 dias. Em relação a produção de pigmentos são classificadas como fotocromógenas, aquelas que produzem pigmentos na presença de luz; escotocromógenas, que produzem pigmentos em ausência de luz; e não-cromógenas, que não produzem nenhum tipo de pigmento carotenoide (RUNYON, 1959) (Figura 1).

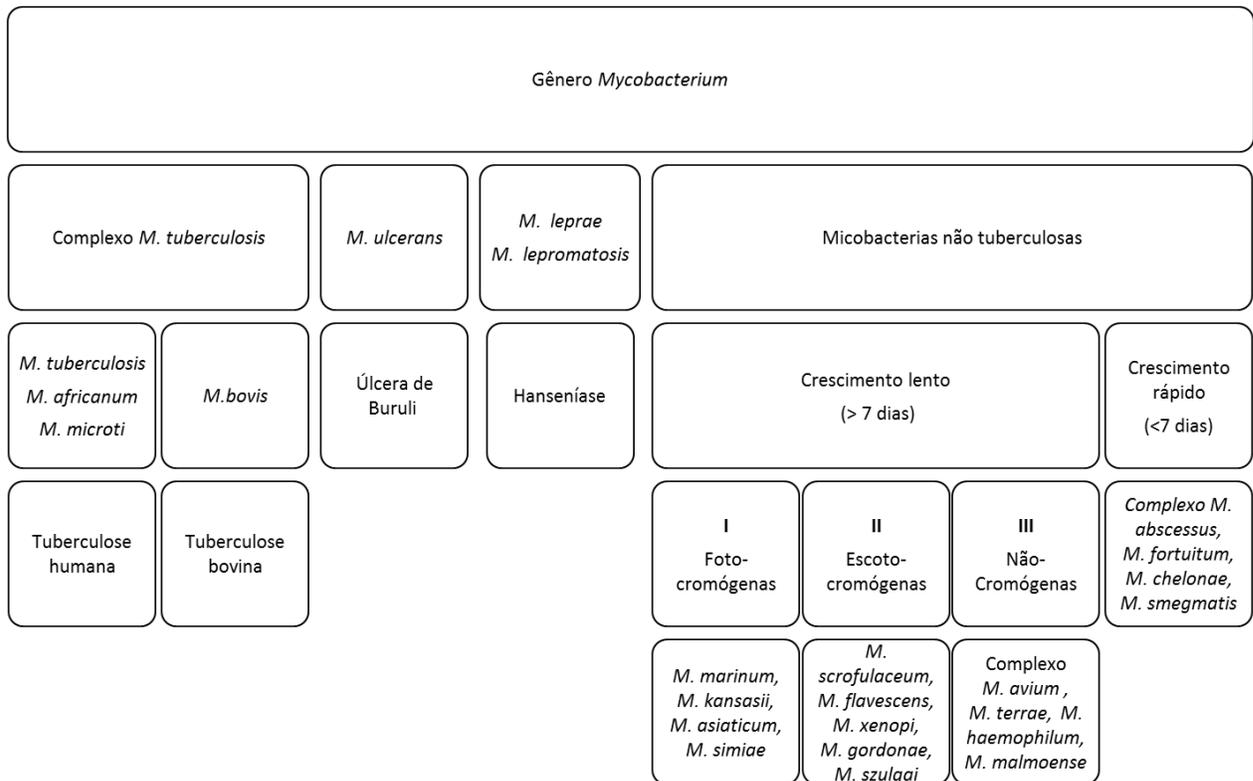


Figura 1. Classificação das micobactérias não tuberculosas (Adaptado de: RUNYON, 1959, American Thoracic Society / Infectious Disease Society of America (ATS/IDSA), 2007).

Com o avanço de técnicas moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA (EL AMIN, 2000; JOAO, 2014; MALEKI, 2017; KIM, 2018), o gene *rpoB* (ZWAAN, 2014; JOAO, 2014; LIU, 2016) e a avaliação do gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (*hsp65*), foi possível uma classificação e diferenciação mais precisa das MNT (ENNA, 2008; HSIAO, 2010; BONA, 2011; SAIFI, 2013; JOAO, 2014; SIMNER, 2015; MALEKI, 2017; KIM, 2018). Mais recentemente, com base na identificação de assinaturas moleculares, especificamente na presença ou ausência de inserções e deleções de aminoácidos (*indels*) compartilhados dentro de um grupo de táxons relacionados, foi atualizada a divisão do gênero *Mycobacterium* (GUPTA, 2018).

Segundo este novo consenso, o gênero foi classificado em dois grandes grupos, que contém a maioria das MNT de crescimento lento (*Mycobacterium*), MNT de rápido

crescimento (*Mycolicibacterium*), e três grupos menores representados pelo complexo *M. terrae* (*Mycolicibacter*), CMABS, *M. chelonae* (*Mycobacteroides*), e um gênero (*Mycolicibacillus*) com apenas *M. triviale* e outras duas espécies (GUPTA, 2018).

Os membros do complexo *Mycobacterium avium* (CMA), se destacam como patógenos oportunistas, sendo os causadores de DP-MNT mais prevalentes (SHAH, 2016; LOPEZ-LUIS, 2020; DALEY, 2020; GOPALASWAMY, 2020). As infecções do CMA podem ocorrer através da inalação, ingestão ou contato dérmico com superfícies colonizadas, como materiais de uso hospitalar (TORTOLI, 2014). Isto tem especial importância, uma vez que esta micobactéria tem a capacidade de resistir diversos a desinfetantes utilizados em centros de prestação de serviços de saúde (RUSSELL, 2014).

Dentro do CMA, as espécies *M. avium* e *M. intracellulare* são as mais importantes clinicamente, mas outros membros do complexo também têm sido associados com doenças em humanos e animais, como apresentado na tabela 1.

ESPÉCIE		HOSPEDEIRO	TIPO DE INFECÇÃO	REFERÊNCIA
<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Humanos	Pulmonar	THOREL, 1990
		Aves	Extrapulmonar	CHIN, 1994
			Pulmonar	AGDESTAIN, 2012 ZHU, 2018
	Suínos	Extrapulmonar		
	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	Humanos	Pulmonar	THOREL, 1990
	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	Ruminantes domésticos	Extrapulmonar	THOREL, 1990
Aves		Tuberculose aviar	TRAN, 2014	
	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Ruminantes	Extrapulmonar	MIJS, 2002
Animais monogástricos		Extrapulmonar	BLANCHARD, 2018	
Humanos		Doença de crohn		
	<i>M. intracellulare</i>	Humanos	Pulmonar	ZHU, 2018
	<i>M. chimaera</i>	Humanos	Pulmonar	RICCARDI, 2020
	<i>M. colombiense</i>	Humanos	Pulmonar	MURCIA, 2006
			Extrapulmonar	ESPARCIA, 2008 BARRETTO, 2016
	<i>M. arosiense</i>	Humanos	Extrapulmonar	BANG, 2008
	<i>M. vulneris</i>	Humanos	Extrapulmonar	VAN INGEN, 2009 CROCE, 2014

<i>M. bouchedurhonense</i>	Humanos	Pulmonar Extrapulmonar	BEN SALAH, 2009 TORTOLI, 2014
<i>M. timonense</i>	Humanos	Pulmonar Extrapulmonar	BEN SALAH, 2009 ZURITA, 2014
<i>M. marseillense</i>	Humanos	Pulmonar	BEN SALAH, 2009 KIM, 2014 GROTTOLA, 2014
<i>M. yongonense</i>	Humanos	Pulmonar	KIM, 2013 MNYAMBWA, 2018
<i>M. paraintracellulare</i>	Humanos	Pulmonar	LEE, 2016
<i>M. lepraemurium</i>	Felinos	Lepra	ROJAS- ESPINOSA, 2001
	Roedores	Extrapulmonar	O'BRIEN, 2017

Tabela 1. Membros do Complexo *Mycobacterium avium* atualmente reconhecidos

2.2. Manifestações Clínicas das infecções pelo Complexo *Mycobacterium avium*

2.2.1. Infecções pulmonares

A DP-CMA pode apresentar-se em três formas, fibrocavitária, bronquiectásica nodular cavitária e bronquiectásica nodular não cavitária. A forma fibrocavitária geralmente progride rapidamente e pode resultar em destruição pulmonar cavitária extensa, fibrose e dano pleural, levando ao quadro de insuficiência respiratória, por esta razão é imprescindível o início imediato do tratamento nestes pacientes, pois os resultados do tratamento não costumam ser favoráveis. Em relação a forma bronquiectásica nodular não cavitária, esta afeta o lóbulo médio direito do pulmão ou a língula, a evolução da doença é em geral mais lenta e, tem melhores resultados no tratamento e desfecho clínico. Já a forma bronquiectásica nodular cavitária, apesar de também apresentar progressão mais lenta, essa progressão se relaciona com mortalidade, nesta forma, os resultados do tratamento serão semelhantes ao tratamento da forma fibrocavitária (REICH, 1992; GRIFFITH, 2007; HAYASHI, 2012).

Uma grande proporção de pacientes com a forma bronquiectásica nodular não cavitária são mulheres de meia-idade, sem comorbidades pulmonares ou histórico de tabagismo, embora também ocorra em morfotipos corporais específicos, como em

mulheres com baixo índice de massa corporal, com características clínicas semelhantes, incluindo escoliose, *pectus excavatum* e prolapso da válvula mitral (REICH, 1995; MIRSAEIDI, 2015; KUMFER, 2017). Por outro lado, a forma fibrocavitária é comum em fumantes mais velhos, do sexo masculino e com sintomas pulmonares crônicos, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (MIRSAEIDI, 2014; DIEL, 2018; IKUYAMA, 2019; DALEY, 2020).

No entanto, é importante notar que há uma grande sobreposição entre esses dois fenótipos. Em mulheres mais idosas, a DP-CMA foi chamada de subtipo "síndrome de *Lady Windermere*" em homenagem a um personagem de uma peça do escritor Oscar Wilde (DHILLON, 2000; KUMFER, 2017; MANTILLA, 2020). Uma contraparte da síndrome de *Lady Windermere*, foi recentemente descrita em homens mais idosos com baixo índice de massa corporal (GONÇALVES, 2016; JUNGBLUT, 2021).

A maior apresentação da DP-CMA em mulheres, tem se relacionado com uma diminuição da produção de hormônios sexuais femininos, como estrogênio e progesterona, o que se relacionada com uma diminuição das funções fagocíticas e da imunidade celular, mecanismos de defesa críticos contra estes microrganismos. Especula-se que a taxa de progressão da doença está relacionada à taxa de declínio dos hormônios esteroides femininos, especialmente o estrogênio, na ausência de terapia de reposição hormonal (DANLEY, 2014; NISHIMURA, 2016; UWAMINO, 2020).

Alguns pacientes com fibrose cística (FC), silicose, ou outras doenças pulmonares de base, também podem ser atingidos pela DP-CMA. Em um estudo transversal multicêntrico, realizado nos Estados Unidos, que incluiu 1.186 pacientes de 21 centros de tratamento para FC, se encontrou que nestes pacientes, 13% tinham colonização nas vias aéreas com pelo menos uma MNT, sendo que 72% destas MNT pertenciam ao CMA. A infecção por membros do CMA esteve associada com idade avançada, maior volume expiratório forçado, colonização concomitante com *Staphylococcus aureus* e menores taxas de colonização por *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, *M. intracellulare* foi a espécie do CMA mais prevalente em amostras com culturas positivas e bacilíferas entre os pacientes com FC (OLIVIER, 2003).

Tem sido demonstrado que entre os pacientes com FC, aqueles que cumprem os critérios clínicos ou microbiológicos da *American Thoracic Society / Infectious Disease Society of America (ATS/IDSA)* para DP-MNT, tendem a ter alterações progressivas na tomografia computadorizada de tórax de alta resolução, consistentes com a progressão e agravamento da doença (OLIVIER, 2003; PARK, 2015; SKOLNIK, 2016).

Outra forma de DP-CMA descrita na literatura é a denominada "pulmão da banheira de hidromassagem", que ocorre em pessoas imunocompetentes que fazem uso frequente de banheiras de hidromassagem, ou outras fontes de água em aerossol. Esses pacientes desenvolvem dispneia progressiva, geralmente acompanhada de tosse não produtiva, febre e calafrios (AKSAMIT, 2002; CAPPELLUTI, 2003; YASIN, 2017).

O correto diagnóstico de DP-CMA, tem especial relevância, principalmente em países com alta carga de TB, e com poucos recursos em técnicas de diagnóstico avançadas (JOHNSON, 2014; CARNEIRO; 2018; BUSATTO, 2020). No Brasil, por exemplo, o diagnóstico de TB ainda é realizado principalmente através da microscopia para a identificação do BAAR, ou observação de achados radiográficos de tórax, sugestivos de TB. Uma vez que pela microscopia ou radiografia não é possível distinguir a espécie de micobactéria causadora da infecção e a apresentação clínica da DP-CMA e a TB são semelhantes, grande parte dos pacientes geralmente são tratados empiricamente com drogas anti-TB de maneira inadequada (GRIFFITH, 2007; HONDA, 2018).

Um diagnóstico mais acertado da DP-CMA permitiria o direcionamento para terapia correta, evitando que o paciente seja exposto a tratamentos mais prolongados, e alguns casos mais tóxicos, com desfechos desfavoráveis (MAIGA, 2012; KANG, 2013).

Um estudo transversal retrospectivo desenvolvido no sul do Brasil, por Busatto *et.al* (2020), avaliou amostras pulmonares de 1.248 pacientes com suspeita de TB. Das 332 culturas de micobactérias positivas, 25 (7,5%) foram identificadas como MNT. Do total das 25 amostras, 18 foram identificadas como *M. avium* (72%), 5 como *M. abscessus* (20%), uma identificada como *M. gastri* (4%) e outra como *M. kansasii* (4%) (BUSATTO, 2020).

O aumento na aparição de casos de DP-MNT em alguns países coincide com uma diminuição nos casos de TB, isto pode ser produto de uma melhor capacidade de identificação e diferenciação das micobactérias, aumento no número de hospedeiros vulneráveis e um maior contato com os ambientes colonizados pelas MNT. Na Coreia do Sul, por exemplo, a apresentação de MNT entre culturas de micobactérias positivas registrou um aumento de 25-40% entre 2001 e 2002, até cerca de 50-70% entre 2010 e 2011 em alguns hospitais de referência. No entanto, a distribuição das espécies de MNT é similar, sendo os membros do CMA, *M. avium* e *M. intracellulare* os microrganismos mais comumente associado com DP-MNT (48-76%) (LEE, 2012; YOO, 2012; KOH, 2013).

2.2.2. Infecções extrapulmonares

A infecção por membros do CMA pode também ocasionar adenopatia intratorácica, osteomielite, artrite séptica, infecções de pele e tecidos moles, infecções musculoesqueléticas e até doença disseminada. Devido ao atraso no diagnóstico, os pacientes frequentemente são tratados de forma empírica, o que pode exacerbar a infecção subjacente e gerar resistência a diversos ATM pelo patógeno (ANIM-APPIAH, 2004; AKAHANE, 2006; PAMPALONI, 2020).

Os membros do CMA, especialmente *M. avium*, são o principal agente etiológico entre as MNT, relacionado à linfadenite em crianças, sendo comum em idades entre um e quatro anos e atingindo especialmente os linfonodos cervicais, a infecção é chamada de escrófula e a principal subespécie implicada é o *M. avium subsp. hominissuis*, com uma taxa entre 3% a 5% em pacientes com linfadenite (THEGERSTRÖM, 2008; ZEHARIA, 2008; AMIR, 2010; TORTOLI, 2012). No entanto, em adultos imunocompetentes a linfadenite cervical por membros do CMA é incomum, sendo que a taxa de aparição é ao redor de 1% (CHRISTENSEN, 2010).

O tratamento da linfadenite associada ao CMA inclui excisão cirúrgica ou terapia com ATM. O risco aumentado de lesão do nervo facial pode ser um fator determinante significativo no uso de ATM em vez de excisão cirúrgica. Cabe destacar que a duração

da terapia com ATM para infecções por membros do CMA nesses casos pode levar até 6 meses (CHRISTENSEN, 2010; WI, 2019).

Os membros do CMA também podem ocasionar doenças cutâneas, com manifestações clínicas que incluem lesões papulonodulares no tronco e nas coxas, manchas eritematosas com pústulas no abdômen, pernas e nádegas, placas na face semelhantes a lúpus vulgar e, geralmente demonstram inflamação granulomatosa. Essas manifestações se caracterizam por ser de curso crônico e de progressão lenta, o que acarreta um diagnóstico tardio (SATTA, 1999; ABOUTALEBI, 2012; PAMPALONI, 2020). Comparado à espécie de *M. avium*, a doença cutânea por *M. intracellulare* é considerada rara, e tem uma apresentação clínica diversa, como abscessos, lesões nodulares, placas eritematosas com bases amareladas ou ulcerações mais profundas, como paniculite, tenossinovite e fascite (KIKUCHI, 2014).

Outra forma de apresentação clínica relacionada aos membros CMA, é a forma disseminada, observada em pacientes com HIV/AIDS, com o sistema imune gravemente comprometido. Estes pacientes apresentam febres altas e persistentes, suores noturnos profundos, perda de peso, anorexia, fadiga e diarreia, muitas vezes associadas a cólicas abdominais (CORTI, 2008). Os achados laboratoriais destes pacientes incluem sinais de anemia, neutropenia ou trombocitopenia e, os achados radiográficos frequentemente demonstram adenopatia difusa na tomografia computadorizada de tórax. A biópsia da medula óssea pode mostrar granulomas, embora possam ser malformados, e a coloração de Ziehl Neelsen em amostras da medula óssea mostra evidências de BAAR, o que deve ser confirmado por cultura microbiológica (GRIFFITH, 2007).

Apesar das infecções disseminadas estarem tipicamente relacionadas à pacientes com HIV/AIDS, outras formas de imunossupressão também têm sido associadas a infecções pelo CMA, como aquelas induzidas pelo uso de terapias imunossupressoras para doenças oncológicas, reumatológicas, neurológicas ou pacientes submetidos a transplantes (HENKLE, 2015).

2.3. Epidemiologia do complexo *Mycobacterium avium*

Além dos fatores já mencionados, as infecções com membros do CMA, assim como com outros microrganismos, têm sido favorecidas pelo avanço antropogênico em ambientes antes inexplorados, o que aumenta o grau de exposição aos patógenos e seu habitat natural, assim como um aumento nos entornos e comportamentos humanos que beneficiam a disseminação do CMA. A exemplo disto está o uso generalizado de chuveiros de água quente, que permitem o desprendimento do patógeno dos ambientes colonizados por estes microrganismos, o trabalho em áreas rurais, agrícolas e de cuidado de animais, e o uso de águas contaminadas, entre outros (FALKINHAM, 2010; THOMSON, 2013; HONDA, 2015; FALKINHAM, 2016; HONDA, 2018; TZOU, 2020; ROCHA, 2020).

Adicionalmente, o aumento no número de hospedeiros imunossuprimidos, induzidos por fatores como o uso de terapias imunossupressoras no tratamento de doenças oncológicas, reumatológicas ou neurológicas, assim como o envelhecimento da população e a desnutrição, também tem sido associado ao aumento de casos de infecção por membros do CMA (SEXTON, 2008; TORTOLI, 2009; JOHNSON, 2014; HENKLE, 2015; RATNATUNGA, 2020). Por outro lado, uma maior compreensão e conscientização, por parte dos profissionais de saúde sobre a existência das MNT também se relaciona ao aumento dos relatos dessas infecções (BALDWIN, 2019).

O monitoramento epidemiológico das doenças causadas pelas MNT apresenta grandes desafios, entre outras coisas porque a notificação dos casos não é obrigatória na maioria dos países, e o isolamento desses microrganismos não é sinônimo de doença, isso porque as MNT são mais comumente associadas com colonização transitória ou contaminação (FALKINHAM, 2016; GRIFFITH, 2016; HONDA, 2018).

Em 2013, Hoefsloot *et. al.*, descreveu a distribuição geográfica de diferentes MNT, neste trabalho foram incluídas as informações de identificação de espécies isoladas de 20.182 pacientes, de 62 laboratórios em 30 países. Os resultados indicaram que entre as MNT mais frequentemente isoladas, estavam os membros do CMA (9.421 isolados; 47%), seguido por *M. gordonae* (2.170 isolados; 11%), *M. xenopi* (1.605 isolados; 8%), complexo *M. fortuitum* (1.322 isolados; 7%), CMABS (664 isolados; 3%) e *M. kansasii* (720 isolados; 4%). Neste estudo, também foi relatado que a maior contribuição do CMA por continente foi encontrada na Austrália (71%) e a menor na América do Sul (31%) (HOEFSLOOT, 2013).

Mais recentemente, Zweijpfenning *et. al.*, (2018), em uma revisão sistemática realizada a partir de 38.686 relatos de isolados de MNT observou que em todos os continentes os membros do CMA foram as MNT mais frequentes associadas à DP-MNT, com diferenças nas taxas para as duas espécies mais importantes do complexo. Na América do Norte e do Sul, o *M. avium* foi a mais frequentemente isolada, 68,5% e 69,5%, respectivamente, já na África e Oceania o *M. intracellulare* representou 77 e 79,5%, respectivamente. Na Europa, 53,2% das DP-MNT foram causadas pelo *M. avium*, e 30,8% por *M. intracellulare*. Já na Ásia, a proporção dos casos de DP-MNT entre as espécies do CMA foi mais semelhante, 16,3% dos casos foram por *M. avium* e 12,7% por *M. intracellulare* (ZWEIJPFENNING, 2018).

Em relação a epidemiologia nas Américas, um estudo realizado nos Estados Unidos relatou que a prevalência anual de DP-MNT aumentou de 20 casos em 1997 para 47/100.000 em 2007, essas informações foram coletadas em bancos de dados correspondente a 5% de beneficiários do *Medicare*; um programa de cobertura de previdência social, que oferece assistência médica a todas as pessoas com mais de 65 anos. (ADJEMIAN, 2012). De outro modo, a partir das informações depositadas em um banco de dados nacional (*Optum Clinformatics Data Mart*), foi relatado um aumento na incidência de casos de DP-MNT de 3,13 em 2008, para 4,73/100.000 em 2015, e um aumento na prevalência dos casos de 6,78 para 11,70/100.000 nesse mesmo período de estudo (WINTHROP, 2020). Ainda, nos Estados Unidos, um estudo que avaliou a distribuição de MNT em Mississippi, Missouri e Ohio, a partir de informação extraída dos sistemas de vigilância de doenças, relatou 2.787 casos de DP-MNT e, entre as espécies mais frequentemente isoladas estavam os membros do CMA em 47% (1.312), seguido por *M. gordonae* em 17% (498), *M. fortuitum* em 7% (188), *M. chelonae* em 4% (100), *M. mucogenicum* em 3% (87), *M. kansasii* em 3% (85), CMABS em 2,5% (77) e *M. peregrinum* em 2% (58), no entanto, 14% dos isolados (404) não foram classificados (DONOHUE, 2021).

Em Ontário no Canadá, um estudo de coorte retrospectivo, de 1998 até 2010, registrou um aumento na prevalência de DP-MNT, de 29,3/100.000 entre 1998 a 2002, para 41,3/100.000 entre 2006 a 2010. Sendo as MNT mais comuns os membros do CMA (12,2/100.000), seguido por *M. xenopi* (3,9/100.000), *M. gordonae* (3,0/100.000), *M. fortuitum* (0,8/100.000) e CMABS (0,6/100.000) (MARRAS, 2013).

No México, em um estudo realizado entre os anos 2001 a 2017 foram avaliados 230 pacientes ingressados a um centro médico por infecções por MNT. A incidência média nos primeiros 11 anos do estudo aumentou de 0,5 a 2,0 casos por cada 1.000 admissões. Entre os pacientes avaliados, 158 (69%) foram considerados como infectados e 72 (31%) como colonizados ou pseudoinfectados. Entre as infecções por MNT, a mais comum foi na corrente sanguínea e doença disseminada em 72 (45%) pacientes, seguido de infecção do tipo pulmonar em 67 (42%) pacientes, e infecção de pele e tecidos moles em 19 pacientes (12%), sendo os membros do CMA os mais comumente isolados entre todas as infecções, afetando principalmente a pacientes com HIV (LOPEZ-LUIS, 2020).

No Brasil, também se destaca o CMA como o principal agente etiológico de DP-MNT. No período de 1996 até 2005, 57,4% das DP-MNT foram ocasionadas por membros do CMA (PEDRO, 2008). Na região sul do Brasil, os membros do CMA foram relatados em 64% das DP-MNT (CARNEIRO, 2018). No entanto, o seguimento epidemiológico se vê mascarado pelas dificuldades no isolamento e identificação do patógeno na infecção ou doença relacionada ao CMA.

Em alguns países europeus, os relatos de doenças relacionadas ao MNT tornam-se relatórios obrigatórios para laboratórios de saúde pública. No Reino Unido por exemplo, todos os isolados de cultura positiva são relatados juntamente com a fonte da amostra e espécie de MNT. Por exemplo, na Inglaterra, País de Gales e Irlanda Do Norte, a notificação de MNT mais do que dobrou entre 1996 e 2006; sendo o isolamento de membros do CMA em idosos foi o principal impulsionador desse aumento na incidência, que foi quase dez vezes maior entre 1995 e 2012 (SHAH, 2016). Na Alemanha um estudo mostrou que a taxa de prevalência de DP-MNT aumentou de 2,3/100.000 para 3,3/100.000 entre 2009 e 2014, este aumento na prevalência mostrou forte associação com idade avançada e doença pulmonar obstrutiva crônica, duas condições que também tem sido fortemente associada ao CMA (RINGSHAUSEN, 2016).

Um estudo que avaliou a relevância clínica dos isolados de MNT de origem pulmonar na Bélgica, entre os anos de 2010 e 2017, identificou 384 pacientes com pelo menos uma amostra respiratória positiva para MNT. Foi relatado um aumento de isolados de MNT de origem pulmonar de 51 em 2010, para 75/100.000 em 2017, destacando os membros do CMA como o mais comumente isolados (53,4%). A maioria destes pacientes

eram homens (60,4%), caucasianos (95,8%), com histórico de tabagismo (56,5%) e com uma idade média de 65 anos. Além disso, entre os isolados associados com DP-MNT, os membros do CMA também foram predominantes (67,3%), especialmente as espécies *M. avium* (31,5%) e *M. intracellulare* (24,8%), seguido pelas espécies *M. xenopi* (8,5%) e CMABS (6,7%). Entre as comorbidades relatadas neste estudo, a DPOC preexistente estava presente em 61% dos pacientes, enfisema em 41,4% e bronquiectasia não-FC em 15,6%. Mais de 20% apresentavam algum grau de imunossupressão (VANDE WEYGAERDE, 2019).

Na República Tcheca, um estudo epidemiológico das doenças ocasionadas por MNT conduzido entre 2008 e 2018 analisou 2.176 isolados pertencentes a 32 espécies de MNT. Entre estes, 303 (13,92%) dos isolados foram identificados como agentes patogênicos causadores de doença, seguindo os critérios microbiológicos e clínicos da ATS/IDSA. As MNT mais frequentemente isoladas foram os membros do CMA, seguidos por *M. kansasii* e *M. xenopi*. Essas espécies representaram quase 90% de todos os isolados de pacientes. Além disso, a incidência média de DP-MNT na área estudada foi de 1,10/100.000 habitantes durante o período de sete anos e esteve principalmente relacionada com infecções por membros do CMA (MODRÁ, 2019).

Alguns estudos de coorte retrospectivo realizados em países asiáticos, como a Coreia do Sul, também tem registrado um aumento na prevalência e incidência de DP-MNT. Entre 2003 e 2016 foi relatado um aumento na prevalência de 1,2/100.000 para 33,3/100.000 e um aumento na incidência de 1,0/100.000 para 17,9/100.000 (PARK, 2019). Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo realizado entre 2007 a 2016, relatando um aumento na prevalência de 6,7 para 39,6/100.000 e aumento na incidência de 6,0 para 19,0/100.000 habitantes (LEE, 2019). No entanto, estes estudos têm focado na prevalência geral de MNT, mas a identificação da espécie causadora da doença não foi relatada.

No nordeste da Tailândia, no período de 2012 a 2016, um estudo retrospectivo foi realizado a partir de isolados clínicos provenientes de 530 pacientes com suspeita de infecção por MNT, dos quais 150 foram definidas como verdadeiras infecções. Entre estas, 114 foram de origem extrapulmonar e 36 de origem pulmonar. Dentre as MNT, tanto em infecções extrapulmonares como pulmonares, CMABS foi o mais encontrado

(25,4% dos casos de infecção extrapulmonar e 27,8% dos casos pulmonares) seguida por CMA (14,9% dos casos extrapulmonares e 13,9% dos casos de infecção pulmonar), além disso, o HIV (8,33%) e hipertensão (8,33%) foram as duas condições subjacentes mais comuns em infecções pulmonares de MNT (KHAM-NGAM, 2018).

No grupo de arquipélagos e ilhas da Polinésia Francesa, território francês no Pacífico Sul, foi realizado um estudo entre 2008 e 2013. Neste trabalho, foram incluídos 87 isolados clínicos de MNT proveniente de 83 pacientes. O sequenciamento parcial do gene *rpoB* identificou 83/87 (95,4%) isolados de MNT, sendo que 42 (48,3%) foram identificadas como *M. fortuitum*, 28 (32,2%) como pertencentes ao CMAB, 8 (9,2%) como *M. mucogenicum* e, apenas 5 (5,7%) pertenciam ao CMA (PHELIPPEAU, 2015).

Cabe destacar um fator que tem sido associado com um aumento nas DP-MNT, o uso descontínuo da vacina BCG, especialmente em países europeus, onde sua aplicação nos últimos anos tem passado de ser universal à seletiva e voluntária (ABATE, 2019; SHAH, 2019; GOPALASWAMY, 2020). Na Finlândia, por exemplo, um estudo nacional retrospectivo das notificações de MNT registradas no Registro Nacional de Doenças Infecciosas entre 1995 e 2016 demonstrou que depois que a cobertura de BCG infantil na Finlândia diminuiu, as infecções de MNT na infância aumentaram drasticamente (KONTTURI, 2018).

Em suma, as taxas de DP-MNT estão aumentando em todo o mundo, este aumento está principalmente impulsionado pelos membros do CMA e, devido ao fato das espécies do CMA estarem frequentemente relacionadas com doenças clinicamente relevantes, pesquisas são necessárias para avaliar o impacto da incidência destas infecções, além da avaliação da abordagem de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DP-MNT associada ao CMA.

2.4. Fatores de risco

Alguns fatores de risco que têm sido associados a um maior desenvolvimento de DP-CMA ou a uma maior progressão da doença, são, por exemplo, a bronquiectasia (GRIFFIT, 2018), que se apresenta tanto como fator de risco, quanto uma consequência da doença por CMA. Outras condições do sistema respiratório também favorecem a infecção por CMA, como a FC (SKOLNIK, 2016); deficiências na produção de α -1

antitripsina, uma proteína que protege contra danos pulmonares (BAI, 2019); enfisema; discinesia ciliar primária (KIM, 2014), uma doença hereditária principalmente autossômica recessiva, caracterizada por defeito estrutural das células ciliadas presentes nos tecidos; TB, doença pulmonar crônica (DPOC) (Carneiro, 2018); imunodeficiências (PFEFFER, 2017), e doença do refluxo gastroesofágico com microaspiração respiratória. (MARTINS, 2005)

A artrite reumatóide é outro fator de risco para o desenvolvimento de DP-CMA, pois aproximadamente 15% a 20% dos pacientes com artrite reumatóide desenvolvem doença pulmonar intersticial crônica subjacente e bronquite. Um estudo de base populacional com acompanhamento de 10 anos em Taiwan mostrou que o risco de doença MNT em pacientes com artrite reumatóide é 4,2 vezes maior do que em pacientes sem artrite reumatóide (LIM, 2018; LIAO, 2016; NAMKOONG, 2016). Além disso, o tratamento imunossupressor utilizado nesses pacientes também aumenta o risco, tanto para o desenvolvimento de TB quanto para a infecção por MNT. Um estudo de base populacional nos EUA descobriu que o risco de desenvolver doença por MNT em pacientes com artrite reumatóide que receberam terapia anti-TNF- α foi aproximadamente 5 vezes maior do que em pacientes com artrite que não receberam anti-TNF- α (QASEM, 2018)

Outro elemento que representa um fator de risco é a desnutrição, que associada a disfunções imunológicas e processos inflamatórios, levam ao aumento da mortalidade em pacientes enfermos. Pacientes com desnutrição geralmente apresentam alterações quantitativas e funcionais nos músculos esqueléticos e respiratórios, e foi estabelecido que a desnutrição também resulta em deficiência de linfócitos. Portanto, os especialistas recomendam o início imediato do tratamento na DP-CMA quando os pacientes com comorbidades também apresentam um estado nutricional deficiente (WAKAMATSU, 2015; OKADA, 2016).

Por outro lado, diversos estudos epidemiológicos destacam que pacientes com DP-CMA são predominantemente mulheres idosas na pós-menopausa, portanto, o sexo é presumido como fator de risco para infecção pelo CMA (REICH, 1995; MARTINS, 2005; IKUYAMA, 2019; KUMFER, 2017; UWAMINO, 2020). Em um estudo realizado por Nishimura *et al.*, (2016), a taxa de infecção por membros do CMA em uma população

saudável foi estimada medindo os títulos de anticorpos IgG contra o antígeno lipídico glicopeptidolipídeo (GPL) específico para os membros do CMA, onde verificou-se que os níveis de anticorpos em mulheres de meia-idade a idosas foram significativamente mais elevados do que em homens ou mulheres mais jovens (NISHIMURA; 2016).

Tem sido sugerido que a diminuição dos níveis de hormônios sexuais, especialmente estradiol (E2), após a menopausa pode representar um fator de risco para DP-CMA. Em uma análise que incluiu 42 pacientes com DP-CMA e 91 controles saudáveis, verificou-se que os pacientes com DP-CMA eram significativamente mais idosos do que os controles saudáveis, tinham um IMC significativamente mais baixo e níveis séricos de E2, testosterona e sulfato de desidroepiandrosterona (DHEA-S) diminuídos, em relação aos controles saudáveis. O estudo revelou uma relação entre os baixos níveis séricos de E2 e DP-CMA em mulheres na pós-menopausa com 65 anos ou menos (DANLEY, 2014).

Tsuyuguchi *et al.*, (2001) relataram que camundongos ovariectomizados apresentaram uma carga bacteriana da espécie *M. avium* mais alta nos pulmões 3-6 semanas após a infecção, em relação aos camundongos operados de forma simulada e camundongos ovariectomizados tratados com E2 (TSUYUGUCHI, 2001). Calippe *et al.*, (2008), descobriram que a administração de E2 a longo prazo a camundongos ovariectomizados aumentou a secreção de IL-1 β e a expressão de óxido nítrico sintase induzível, aumentando assim a destruição de bactérias gram negativas intracelulares por macrófagos após estimulação de lipopolissacarídeo (CALIPPE, 2008).

Finalmente, alguns estudos indicaram que a deficiência de vitamina D está associada à suscetibilidade e progressão de várias doenças infecciosas. Liu *et al.*, (2006) mostrou que a vitamina D regula a expressão do gene do peptídeo antimicrobiano da catelicidina humana (CAMP): a única catelicidina humana, a proteína antimicrobiana catiônica humana (hCAP) 18 e seu fragmento C-terminal de 37 aminoácidos (LL-37), têm múltiplas funções e desempenham papéis importantes no sistema imunológico inato. hCAP18 / LL-37 suprime o crescimento de micobactérias em macrófagos e tem efeitos antimicrobianos (LIU; 2006).

Atualmente sabe-se que a vitamina D tem importantes efeitos imunomoduladores. Fujita *et al* (2018) conduziu um estudo de coorte prospectivo para investigar a associação entre DP-CMA, níveis de vitamina D sérica e níveis de hCAP18 / LL-37. Os pacientes com DP-CMA apresentaram níveis séricos de hCAP18 / LL-37 significativamente baixos, além de estarem associados a um índice de massa corporal significativamente menor (FUJITA, 2018; FUJITA, 2013).

2.5. Transmissão

Os membros do CMA multiplicam-se e persistem em diversos ambientes, como solos, especialmente ricos em turfa, florestas de pinheiros e fontes de água natural (PRIMM, 2004; GROOTE, 2006; FALKINHAM, 2013; LAHIRI, 2014). Análises genotípicas foram capazes de identificar por meio de tipagem molecular o DNA de membros do CMA isolados em domicílios de pacientes com DP-CMA (THOMSON, 2013; LANDE, 2019; TZOU, 2020).

A infecção ocorre pela inalação de gotículas de aerossol contendo células das diferentes espécies do CMA (FALKINHAM, 2013). Essas gotículas podem ser geradas a partir de fontes de água natural, mas também por fontes artificiais como chuveiros, torneiras, jacuzzis, piscinas de hidroterapia ou ainda a partir de sistemas de ventilação, como ar-condicionado e umidificadores (CAPPELLUTI, 2003; LUMB, 2004). É provável que uma segunda fonte de infecção seja a partir da aspiração pelo refluxo gástrico, assim como pela ingestão do patógeno presente na água e alimentos contaminados (THOMSON, 2007).

A presença de espécies pertencentes ao CMA no encanamento hospitalar está associada a infecções nosocomiais potencialmente mortais. Tubos hospitalares e equipamentos médicos contendo água, como broncoscópios, podem ser colonizados por membros do CMA e, portanto, transferidos para os pacientes durante o exame ou coleta de amostras (D'ANGELO, 2004). Um exemplo recente de infecção hospitalar associada ao CMA foi revelado em outubro de 2015, quando *M. chimaera* foi relacionado com a colonização de sistemas de aquecedores-resfriadores, que foram usados durante cirurgia cardíaca, e os pacientes foram infectados como resultado de aerossolização de células de *M. chimaera* durante a cirurgia (BENGTSSON, 2018; NOJOSA, 2019; HASSE, 2020).

Considerando a ubiquidade do CMA, os esforços para erradicá-lo de possíveis fontes de infecção são frustrados pela aderência à superfície e a formação de biofilmes (CLAEYS, 2018; MULLIS, 2013; FALKINHAM, 2018; ESTEBAN, 2018). Sem aderência, o patógeno seria eliminado em qualquer sistema de fluxo, como rios e condutas de água. A adesão às superfícies é favorecida pela elevada hidrofobicidade na superfície celular da micobactéria, esta ação reduz a área da superfície em contato com os íons positivos

e negativos da água, assim o CMA pode ser "pioneiro em biofilmes", aderindo às superfícies por meio de interações hidrofóbicas antes de outros microrganismos, "condicionando" as superfícies para maior colonização microbiana (MULLIS, 2013; FALKINHAM, 2018; FALKINHAM 2020)

Por outro lado, a resistência de membros do CMA aos processos de desinfecção química e física usados no tratamento de água torna ainda mais difícil a eliminação (RUSSELL, 1999; JAMAL, 2000). Foi documentado que o *M. avium* resiste a biocidas como cloro ou cloramina, monoclорamina, dióxido de cloro e tratamentos como irradiação ultravioleta, ozonização e filtração. Além disso, o CMA tem a capacidade de crescer em ambientes com baixas concentrações de matéria orgânica, é resistente a altas temperaturas, e pode crescer em baixas concentrações de oxigênio (TAYLOR, 2000; JAMAL, 2000; NORTON, 2004; ALTIC, 2007; RUSSELL, 2014).

2.6. Patogenia

Membros do CMA podem ingressar no organismo humano por inalação de aerossóis presentes no meio ambiente, colonizar o epitélio alveolar e infectar os pneumócitos do tipo II ou *Alveolar Epithelial Type II* (AEC2) (SATO, 2002). Os AEC2 constituem 60% da população celular do alvéolo, porém, ocupam apenas 10% da superfície alveolar. Sua função é difundir gases através da barreira hemato-alveolar e produzir o líquido surfactante, além disso, pela sua divisão dão origem a novos pneumócitos tipo I (AEC1). No epitélio saudável, os macrófagos fagocitam os patógenos, junto com a proteína D do fluido surfactante que se liga ao CMA para ajudar em sua eliminação (WONG, 2013; BRANDT, 2002 BRODE, 2017).

O CMA se liga à matriz extracelular exposta, pela ligação à proteína de ligação à fibronectina (FAP). A FAP tem função de aderência na superfície dos macrófagos e se liga na membrana celular através de receptores de integrina (KITAURA, 2000; SECOTT, 2001; VIALE, 2014). Foi demonstrado que a CMA adere às superfícies do epitélio lesado onde a FAP está disponível, promovendo maior dano à área, dessa forma, a DP-CMA aparece como um problema importante naqueles pacientes com aumento na produção de muco ou diminuição da depuração das vias aéreas. Além disso, em pacientes com

doenças pulmonares estruturais pré-existentes, o epitélio danificado facilita a aderência e promove uma rápida invasão do tecido (KITAURA, 2000; SECOTT, 2001; SATO, 2001; MIDDLETON, 2004; YAMAZAKI, 2006; VIALE, 2014).

Outra via de entrada dos membros do CMA, é a via gastrointestinal, que ocorre por meio da ingestão de alimentos e água contaminados. O CMA atinge o estômago, sobrevive ao pH ácido e, por fim, é depositado no íleo. O íleo contém acúmulos de tecido linfóide, chamados de placas de Peyer, formados principalmente por linfócitos B, que sintetizam a IgA, a qual opsoniza o patógeno para que este possa ser processado por células apresentadoras de antígeno (APCs) e apresentando a linfócitos T, desencadeando uma resposta imunológica. Os membros do CMA também colonizam os gânglios linfáticos do mesentério e os gânglios linfáticos cervicais (CHIN, 1994; BERMÚDEZ, 2001; KHAN, 2011; PARK, 2017). Quando o sistema imune do hospedeiro fica comprometido, o CMA se espalha para outros órgãos, causando a forma disseminada da doença.

Diante da invasão pelo CMA, são geradas respostas imunes inatas e adaptativas que auxiliam na defesa do organismo, como fagocitose por macrófagos, monócitos, APCs e células dendríticas, por outro lado, as células NK eliminam as células infectadas e promovem o recrutamento Linfócitos T CD4 + (LT-CD4). Durante a infecção por CMA, os macrófagos são estimulados a produzir citocinas, como interleucina (IL) 1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), chaves na resposta inflamatória. No entanto, a DP-CMA não é caracterizada por uma forte resposta inflamatória, foi observado que o *M. avium* promove a supressão de citocinas, como a IL-8 (MANNERING, 2002; CHINEN, 2005; GONZÁLEZ-PÉREZ, 2013; HAUG, 2013; SHU, 2017).

Os macrófagos também são estimulados pelas IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF), que auxiliam na defesa do organismo no controle da infecção. Deve-se notar que a IL-12 secretada por APCs ativa LT-CD4, estimula a produção de células T citotóxicas e células NK, no entanto, CMA gera uma supressão progressiva na produção de IL-12 à medida que a infecção progride (SHU, 2017; HAN, 2020).

A parede celular hidrofóbica rica em lipídios do CMA possui três tipos de componentes em seu núcleo: arabinogalactanos, peptidoglicanos e ácidos micólicos, estes últimos se encontram embalados com uma variedade de GPL, expostos na superfície e que são responsáveis pela morfologia característica das colônias do CMA, além das propriedades imunomoduladoras (BRENNAN, 2003; SCHOREY, 2008).

Os resíduos de oligossacáridos dos GPL no CMA são do tipo polar e são específicos de cada sorotipo (SAITO, 1990; MATSUNAGA, 2008; MUKHERJEE, 2012). O GPL específico do sorotipo é responsável pela subdivisão das duas espécies do CMA principais, *M. avium* (sorotipo 1 a 6, 9 a 11 e 21) e *M. intracellulare* (sorotipo 7, 12 a 20 e 25). Atualmente tem sido identificados até 31 sorotipos, e estes não abrangem todas as espécies do CMA, razão pela qual a sorotipagem não é indicada para fins clínicos. Seu principal interesse é epidemiológico, e só está disponível em alguns laboratórios de referência (CHATTERJEE, 2001; FUJIWARA, 2008; MATSUNAGA, 2008).

A presença de GPL em *M. avium* pode promover uma mudança nas funções dos macrófagos, evitando a fusão fagossoma-lisossoma e, conseqüentemente, limitando a exposição a enzimas hidrolíticas (BHATNAGAR, 2011; KOBAYASHI, 2014). Pacientes infectados com espécies do CMA apresentam resposta alterada de linfócitos T contra antígenos específicos do CMA, isso se deve à supressão da proliferação de linfócitos contra a GLP (SHU, 2017). Por outro lado, os macrófagos infectados com membros do CMA secretam prostaglandina E2 (PGE2), que inibe a proliferação de linfócitos, interferindo na ativação de macrófagos mediada pela liberação de INF- γ (RASTOGI, 1992; VENKATAPRASAD, 1996).

A ligação do CMA às células fagocíticas ocorre pela aderência do patógeno a receptores do sistema complemento, receptores de manose, receptores para os fragmentos Fc de anticorpos opsonizantes e receptores transmembrana, gerando um sinal para a evaginação da membrana e internalização do fagossoma (BERMUDEZ, 2001; BOHLSON, 2001). Uma vez dentro do citoplasma, o fagossoma começa sua destruição por radicais reativos de oxigênio (ROS) ou pela união de lisossomos, que se ligam ao fagossoma formando um fagolisossoma, dentro do qual são liberadas enzimas tóxicas que destroem o patógeno (VOSKUIL, 2011; ECKELT, 2015; SHASTRI, 2018).

No entanto, o CMA tem a capacidade de inibir a fusão de fagolisossomos, impedindo a acidificação do vacúolo fagocítico e alterar o seu metabolismo para se adaptar e sobreviver em um ambiente intracelular, sendo monócitos e macrófagos células ideais para hospedar esse patógeno. Conforme a infecção progride, sua replicação constante em APC causa apoptose, facilitando ainda mais a disseminação do CMA, quando o CMA evita a apoptose, infecta outros APCs não infectados recém-recrutados, promovendo ainda mais sua disseminação (HARTMANN, 2001; DOMINICI, 2012; DOMINICI, 2008).

2.7. Diagnóstico

No diagnóstico laboratorial das infecções ocasionadas pelos diferentes membros do CMA, a microscopia baseada na detecção de BAAR, apenas caracteriza a presença de micobactérias em uma amostra clínica, no entanto, não permite a identificação do CMA. Ao contrário do cenário de TB pulmonar, para o diagnóstico da DP-CMA a cultura de escarro positiva e a baciloscopia não é suficiente para estabelecer um diagnóstico (JEYANATHAN, 2006; GRIFFITH, 2007; CUDAHY, 2016). Com o intuito de orientar um melhor diagnóstico de DP-MNT, a ATS e a IDSA publicaram critérios de diagnóstico baseados em uma combinação de dados clínicos, radiográficos e microbiológicos.

Os critérios clínicos baseiam-se em sintomas pulmonares, opacidades nodulares ou cavitárias em radiografia de tórax ou tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) mostrando bronquiectasia multifocal com múltiplos nódulos pequenos. Por outro lado, os critérios microbiológicos requerem a cultura de pelo menos duas amostras separadas de escarro expectorado ou a cultura positiva de pelo menos um lavado brônquico ou uma biópsia com características histopatológicas micobacterianas (inflamação granulomatosa ou BAAR) (GRIFFITH, 2007).

A cultura em meios sólidos específicos, como os meios de Löwenstein-Jensen ou Ogawa-Kudoh, embora permita a identificação de isolados de micobactérias baseada em taxas de crescimento, pigmentação da colônia e testes bioquímicos como produção de niacina e redução de nitrato, esses testes podem resultar em erros na identificação das espécies de *Mycobacterium*. Por exemplo, as espécies do CMA apresentam uma ampla

gama de variabilidade de colônias, de lisas a ásperas, de não pigmentadas a creme e amarelo brilhante, assemelhando-se a muitas outras espécies de micobactérias. Por outro lado, a cultura líquida semiautomática permite detectar o crescimento em torno de dez dias, mas o tempo necessário para a realização dos testes de identificação bioquímica e sensibilidade aos antibióticos ainda é considerável, durando dias ou semanas (VAN INGEN, 2015; COWMAN, 2018; PENNINGTON, 2021)

No caso da DP-CMA a identificação da espécie é importante uma vez que *M. avium* e *M. intracellulare* diferem nas características clínicas, na progressão da doença e na resposta ao tratamento (SHIN, 2010). *M. intracellulare* tem sido associada principalmente a infecções oportunistas como bronquiectasias e doença pulmonar cavitária (BEGGS 2000).

Koh, *et. al.* (2012), relataram que entre pacientes com DP-CMA, aqueles infectados por *M. intracellulare* foram mais propensos a desenvolver doença fibrocavitária, apresentaram níveis aumentados de marcadores inflamatórios, baciloscopia positiva e uma taxa de resposta ao tratamento mais baixa (KOH, 2012). Em contrapartida, as infecções ocasionadas pela espécie *M. avium* tem sido relacionadas a pacientes HIV positivos com um baixo número de LT-CD4, ocasionando principalmente doenças disseminadas, o que sugere que a imunodeficiência celular é um fator de risco para a infecção por *M. avium* (TOMIOKA, 1993; KOH, 2012).

Diversos estudos têm se mostrado uma maior prevalência de *M. avium* relacionado com o CMA, especialmente ligado a pacientes imunocomprometidos (BOYLE, 2015; LOEBINGER, 2017; CHANG, 2020), porém, também tem sido relatado que a espécie *M. intracellulare* é mais patogênica, apresenta maiores taxas de resistência e maiores chances de reinfecção (HAN, 2005; NISHIUCHI, 2017). No entanto, os estudos que avaliam a epidemiologia diferencial das espécies do CMA são escassos, mas considerando o aumento na prevalência do CMA, o aprofundamento em estudos epidemiológicos e a implementação de uma notificação compulsória deste patógeno é urgente.

Neste sentido, para correta identificação das espécies causadoras de infecções por CMA, destaca-se o uso de métodos moleculares. Entre os métodos de identificação

de espécies, se destaca o uso de sondas de DNA, com uma plataforma de hibridização reversa. Entretanto este kit não identifica todas as espécies do CMA, incluindo *M. chimaera* (CLOUD, 2005; TORTOLI, 2010), bem como não permite a discriminação das subespécies de *M. avium* (DEVALOIS, 1997).

O ensaio GenoType NTM-DR (NTM-DR; Hain Lifescience, Nehren, Alemanha) é outro método de hibridização reversa que permite a identificação ao nível de espécie ou subespécie as MNT mais prevalentes, o ensaio permite a identificação das espécies do CMA (*M. avium*, *M. intracellulare* e *M. chimaera*), *M. chelonae* e subespécies pertencentes ao CMAB. O ensaio NTM-DR também permite a detecção de resistência a macrolídeos e aminoglicosídeos. No entanto, em um trabalho publicado por Huh *et al.*, (2019), o ensaio GenoType NTM-DR foi avaliado para identificar espécies de CMA e se encontrou que algumas cepas do CMA diferentes de *M. intracellulare* apresentaram reação cruzada com a sonda de *M. intracellulare* (MOK, 2017; HUH, 2019).

No entanto, apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, estes testes são comerciais e tem um custo elevado, limitando seu uso na rotina de um laboratório de análises clínicas.

Outra ferramenta molecular útil, é o sequenciamento do gene 16S rRNA, considerado o método padrão ouro na identificação de espécies de micobactérias, uma vez que permite a discriminação até o nível de espécie do complexo para algumas micobactérias, especialmente de rápido crescimento (WOO, 2000). No entanto, a análise da sequência deste gene não permite a discriminação adequada entre todos os membros do CMA, mas se mostra particularmente útil na discriminação entre *M. avium* e *M. intracellulare* (TAYLOR; 2000; FALKINHAM, 2013), apesar dessa metodologia permanecer com aplicação limitada a laboratórios de referência.

Outros alvos genéticos usados na identificação de micobactérias são os genes *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase bacteriana (SALAH, 2008, ADEKAMBI, 2009), e o gene *hsp65*, sendo um gene encontrado em todas as espécies de micobactérias, com sequências de nucleotídeos específicas para cada espécie (TURENNE, 2006; CHIMARA, 2008). À análise do gene *hsp65* tem sido utilizado tanto em PCR, quanto em análise de restrição enzimática de polimorfismos (PRA), baseada

na amplificação enzimática do gene *hsp65* seguida de digestão com duas enzimas de restrição (Bst-EII e Hae-III) (BEGGS, *et al.*, 2000; TURENNE, 2006; SHIN, 2020).

Por outra parte, a hibridação de *Southern blot* para o elemento de inserção *IS1245*; presente consistentemente nas cepas de *M. avium* e ausente em cepas de *M. intracellulare*, se apresenta como uma técnica útil para a diferenciação entre espécies do CMA (RITACCO, 1998; PANUNTO, 2003). No entanto, *IS1245* não está presente em *M. avium subsp. paratuberculosis*, podendo levar a uma interpretação dos resultados errônea na hora de diferenciar estas duas espécies (JOHANSEN, 2005).

Além disso, outros ensaios moleculares têm mostrado resultados na diferenciação entre espécies. O uso da PCR para a amplificação do gene *mig*, um provável fator de virulência de *M. avium* (PLUM, 1997; MORSCZECK, 2001), fornecendo uma maneira simples e útil de diferenciar *M. avium* e *M. intracellulare*. A presença desse gene em cepas de *M. avium*, mas não em *M. intracellulare*, sugere que essas duas espécies podem diferir em seus mecanismos de virulência (MASLOW, 1999; BEGGS, 2000). Outra metodologia baseada nos ensaios de PCR, útil para a identificação de espécies de CMA é o uso das sondas DT1 e DT6, sequências de cópia única identificadas no genoma de *M. avium* sorotipo 2 (SIRCILI, 1999), sendo assim, a amplificação positiva de DT6 sugere a presença de *M. avium* (sorotipos 1 a 6, 8 a 11 e 21), enquanto à amplificação positiva de DT1 é observada em cepas de *M. intracellulare* (sorotipos 2, 3, 7, 12 a 20 y 23 a 25) (DEVALLOIS, 1996; DEVALLOIS, 1997; GARRIGA, 1999; GLODÍC, 2019).

Outro elemento importante a considerar é a discriminação precisa entre as quatro subespécies de *M. avium* a partir das diferenças moleculares nas sequências de inserção específicas (IS), sendo assim, por exemplo, a *IS900* é específica de *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. avium subsp. hominissuis* e *M. avium subsp. avium*. Já, *IS901* está presente em *M. avium subsp. avium* e *M. avium subsp. silvaticum*, mas ausente *M. avium subsp. hominissuis* e, como se mencionou anteriormente, a *IS1245* é comum para as três subespécies de *M. avium*, mas não está presente em *M. avium subsp. paratuberculosis* (KOMIJN, 1999; OLIVEIRA, 2003 BANNANTINE, 2020; SHIN, 2020).

Alguns testes sorológicos baseados nos diferentes perfis de conteúdo lipídicos das espécies de CMA também são utilizados (SCHAEFER, 1965). Alguns estudos têm

avaliado o papel do diagnóstico sorológico a partir de imunoenaios enzimáticos para detectar anticorpos da classe IgA contra o antígeno GPL-apolar específico do CMA (KITADA, 2005; KITADA, 2013; KOBASHI, 2013).

Nishimura *et al.*, (2009) identificou os títulos de anticorpos IgG contra antígenos lipídicos monomicolato de trealose (TMM-M) e GPL-apolar. Neste estudo, os títulos de anticorpos contra TMM-M e apolar-GPL foram significativamente maiores em pacientes com DP-CMA do que os dos outros grupos de pacientes ou dos indivíduos controle. Os títulos de anticorpos contra TMM-M apresentaram sensibilidade de 89,2% e especificidade de 97,0%, e os títulos de anticorpos contra GPL-apolar apresentaram uma sensibilidade de 89,2% e especificidade de 94,0% (NISHIMURA, 2009; VERDIER, 2013; NISHIMURA, 2015). Desta maneira, as medições de títulos de anticorpos contra TMM-M e GPL-apolar seriam úteis no diagnóstico de DP-CMA e no diagnóstico diferencial de doença pulmonar micobacteriana.

Essas ferramentas sorológicas têm trazido também avanços na identificação de membros do CMA. A identificação por sorotipos, por exemplo, permite classificar as espécies do CMA em um grupo de 28 sorovares, incluindo as duas espécies intimamente relacionadas, *M. avium* e *M. intracellulare* e esta designação também pode incluir outros grupos menos definidos (MAEKURA, 2005).

Por outra parte, existem outros métodos que podem ser usados para identificar as espécies do CMA, incluindo a cromatografia HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) (DUFFEY, 1992; JOST, 1995; LEE, 2009; MIRZAPOUR, 2016; SEBASTIAN, 2018) e a análise por espectrometria de massa e analisador de massas do tipo tempo-de-vôo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) (MEDIAVILLA, 2015; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2015; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2016; NEUSCHLOVA, 2017; ALCOLEA-MEDINA, 2019; FAWZY, 2018). A principal diferença nestes métodos está em seu poder discriminatório e custos. HPLC é a abordagem mais barata, no entanto, ele tem a menor capacidade de discriminar entre espécies e subespécies, enquanto a espectrometria de massa MALDI-TOF tem um bom poder discriminatório, mas é incapaz de distinguir microrganismos de forma confiável dentro do CMA. No entanto, essas abordagens são limitadas a laboratórios de pesquisa e não são amplamente distribuídas em laboratórios de análises clínicas.

2.8. Tratamento

O tratamento da DP-CMA é baseado em diferentes protocolos. Embora não haja um tratamento padrão, os ATM utilizados são os mesmos independentemente da espécie envolvida na infecção. O início do tratamento requer consideração da deterioração clínica e radiográfica. Alguns especialistas sugerem que, devido aos efeitos adversos frequentes e graves dos ATM, a cura microbiológica pode não ser possível, especialmente em pacientes idosos. Para esses pacientes, a infecção por CMA pode ser vista como uma doença crônica, geralmente indolor e incurável. Nesses pacientes, a opção cirúrgica também pode ser adequada (KWON, 2019; GRIFFITH, 2020).

As diretrizes da ATS / IDSA afirmam que "fazer o diagnóstico de DP-MNT não requer a instituição de terapia com ATM, que é uma decisão baseada nos possíveis riscos e benefícios da terapia para pacientes individuais". E isto se aplica especialmente quando analisamos as diferentes formas de apresentação e evolução da DP-CMA. Em pacientes com a forma bronquiectásica nodular da DP-CMA, o início do tratamento não ocorre de imediato, mesmo quando atendem aos critérios diagnósticos da ATS / IDSA, uma vez que a evolução da doença é mais lenta do que em pacientes com a forma fibrocavitária.

No entanto, alguns estudos observacionais sobre o curso natural da forma bronquiectásica nodular da DP-CMA demonstraram que, com o tempo os pacientes necessitarão de tratamento com ATM devido à progressão da doença. Lee *et al.*, (2013) descobriu que quase metade dos 265 pacientes com bronquiectasia nodular na DP-CMA, necessitaram do início do tratamento durante um seguimento médio de 32 meses (LEE, 2013). Kitada *et al.*, (2013) relatam que 22,2% de 76 pacientes com bronquiectasia nodular na DP-CMA apresentaram deterioração radiológica durante um período de observação de 5 anos (KITADA, 2013).

Desta forma, observa-se que na forma de bronquiectásica nodular, o curso da doença é que irá definir a necessidade ou não de tratamento. Em pacientes que apresentam a forma bronquiectásica nodular cavitária, ou seja, apresentam como evolução cavitações na radiografia, indica-se o início imediato do tratamento. No entanto, em pacientes que cursam com a forma não cavitária, ou seja, que não apresentam

progressão radiográfica, muitas vezes a cura espontânea da doença juntamente com a espontânea conversão da cultura negativa pode ocorrer, sendo assim, opta-se por um acompanhamento atento da evolução da doença. (KITADA, 2013, GRIFFITH, 2020).

Um estudo recente realizado na Coreia, analisou o curso da doença em 551 pacientes com diagnóstico da forma bronquiectásica nodular não cavitária da DP-CMA. Aproximadamente 40% deles não receberam tratamento dentro de três anos a partir da data do diagnóstico. Neste estudo, a conversão espontânea da cultura ocorreu em aproximadamente 50% dos pacientes que não receberam nenhum tratamento, portanto, adotar uma abordagem de acompanhamento e observação sem início imediato do tratamento, parece benéfico para muitos pacientes com esta forma de DP-CMA, na maior parte das vezes menos agressiva (KO, 2018).

Por outro lado, também tem sido sugerido que existe uma diferença na resposta ao tratamento das formas de DP-CMA em relação à presença de infecções por um ou mais clones das espécies do CMA. Com base em análises genéticas, foi demonstrado que uma infecção policlonal, considerada composta por clones de *M. avium* ou *M. intracellulare* com uma diferença em dois ou mais *loci*, foi predominante na doença bronquiectásica nodular, enquanto, a infecção monoclonal foi predominante na forma fibrocavitária (KIMIZUKA, 2019).

Embora a relação precisa entre policlonalidade e patogenicidade permaneça obscura, dada a natureza multifocal da doença bronquiectásica, o potencial de infecção de diferentes locais do pulmão com diferentes clones da mesma espécie ou ainda por populações mistas parece bastante plausível (SLUTSKY, 1994). Adicionalmente, também Wallace *et al.*, (1996), em seu estudo demonstrou que a infecção com uma única cepa de algum membro do CMA, é predominante na forma fibrocavitária da DP-CMA, mas que os pacientes com a forma de bronquiectasia nodular da doença estão infectados com cepas de diferentes espécies do CMA (WALLACE JR, 1996).

Já foi sugerido que a presença de uma infecção policlonal, pode se tornar um preditor de deterioração clínica da forma leve e lenta da DP-CMA. No entanto, a deterioração da doença em uma infecção policlonal também já foi associada a presença de cepas pertencentes a clusters específicos (NAKAGAWA 2012). De qualquer forma,

em casos de pacientes com DP-CMA na forma bronquiectásica nodular que apresentam infecção policlonal, pode requerer o início do tratamento, a fim de retardar a deterioração da função pulmonar, melhorando assim as lesões pulmonares reversíveis (KIMIZUKA, 2019).

Naqueles pacientes em que há a necessidade do uso de tratamentos com ATM, o tratamento é baseado na combinação de ATM de diferentes classes. A terapia recomendada pela ATS / IDSA inclui o uso de macrolídeos, RIF e EMB e, em alguns casos, é adicionado um aminoglicosídeo, como a AMI, na forma injetável ou por inalação. Os macrolídeos como CLA e azitromicina são a base do tratamento, portanto, o desenvolvimento de resistência aos macrolídeos está associado a falhas terapêuticas e maior mortalidade (GOCHI, 2015; MAURER, 2015; MOON, 2016).

Em pacientes com DP-CMA sensível a macrolídeos, o ATS / IDSA sugere regimes de tratamento baseados em azitromicina em vez de regimes baseados em CLA, uma vez que a azitromicina tem melhor tolerância, menos interações com outros ATM e menor carga de comprimidos. No entanto, quando a azitromicina não está disponível ou não é tolerada, a CLA é uma alternativa aceitável. O ponto mais frustrante e inexplicável em relação ao desenvolvimento de resistência aos macrolídeos é que ela pode ocorrer mesmo em pacientes que receberam o esquema recomendado de três ATM orais (GRIFFITH, 2007; WALLACE JR, 2013; HAWORTH, 2017; DALEY, 2020).

A escolha do regime de tratamento é baseada nos resultados dos testes de sensibilidade aos ATM, *Antimicrobial Susceptibility Testing* (AST), determinando a concentração inibitória mínima (CMI) em ensaios *in vitro*, que servem como um guia para uma resposta *in vivo* eficaz. No caso do tratamento da DP-CMA, o AST é indicado para macrolídeos e AMI, uma vez que os valores de CIM para RIF e EMB não apresentam boa correlação clínica. Postula-se que a falta de correlação pode estar associada à formação de biofilmes embutidos na matriz extracelular, o que permite ao CMA resistir ao ataque da resposta imune e à ação de ATM (HUANG, 2002; DORBNIEWSKI, 2002).

No entanto, em estudo de Kwon *et al.*, (2018), foi sugerido que o desenvolvimento de resistência aos macrolídeos, mesmo após o tratamento recomendado pela ATS / IDSA, estava relacionado aos resultados de CIM dos testes AST para RIF e EMB. Em

outras palavras, se a CIM de RIF e EMB forem altas e os isolados sejam classificados como resistentes, a eficácia do regime de três ATM orais seria a mesma que a eficácia da monoterapia com macrolídeo e poderia eventualmente levar ao desenvolvimento de resistência aos macrolídeos. O estudo mostrou que as CIM *in vitro* de RIF e EMB são um preditor do resultado do tratamento em pacientes tratados com um regime padrão (KWON, 2018).

Além disso, tem sido sugerido que uma alta carga bacteriana, somada a uma baixa concentração sérica de ATM, está relacionada ao desenvolvimento de resistência aos macrolídeos (MOTAMEDI, 2014; PARKER, 2020; SAXENA, 2021; SHIMOMURA · 2015).

Entre as razões pelas quais as espécies do CMA se tornam resistentes aos macrolídeos, foi descrito um regime inadequado no início da doença. Griffith *et al.*, (2006) relatou que 76% dos pacientes com DP-CMA resistente aos macrolídeos, começaram o tratamento com monoterapia com macrolídeos, ou com a combinação de um macrolídeo e uma fluoroquinolona (GRIFFITH, 2006). Morimoto *et al.*, (2016) mostraram que 60,2% dos pacientes não receberam esquemas adequados de combinação de ATM, como CLA em monoterapia, CLA associada a fluoroquinolona, e esquemas sem EMB, desenvolveram resistência à terapia com macrolídeos (MORIMOTO, 2016). Moon *et al.*, (2016) relataram que um terço da população que não recebeu EMB devido aos seus eventos adversos desenvolveu resistência à terapia com macrolídeos (MOON, 2016)

O EMB é o segundo ATM mais importante no regime de tratamento, no entanto, a administração de EMB em longo prazo está associada a diferentes efeitos adversos, os mais comuns são a neuropatia óptica; que ocorre em 5% a 10% dos pacientes, bastante superior aos pacientes com TB, que fica em torno de 2%. Isso pode ser devido à idade avançada geral e à maior duração do tratamento em pacientes com DP-CMA (GRIFFITH, 2005; KIM, 2019; KWON, 2020).

Além da neuropatia óptica, erupções cutâneas e distúrbios gastrointestinais são as razões mais comuns para a descontinuação do EMB em pelo menos 25% dos pacientes com DP-CMA e, o próximo passo na prática clínica após sua descontinuação não é muito claro, no entanto, a taxa de falha terapêutica quando o EMB é interrompido

é maior do que em aqueles pacientes que completam o regime padrão proposto pela ATS (LEE, 2020).

Em pacientes nos quais o EMB é descontinuado têm sido usadas fluoroquinolonas de última geração, como levofloxacina e moxifloxacina. No entanto, a eficácia das fluoroquinolonas em pacientes com DP-CMA é baixa. Os autores sugeriram que nos casos em que o EMB precise ser descontinuado devido a eventos adversos, outros ATM potenciais devem ser prescritos em vez de fluoroquinolonas, como aminoglicosídeos, ou um ou mais ATM em conjunto com fluoroquinolonas (SHUTO, 2020; KHADAWARDI, 2020; KOHNO, 2007; YAMABA, 2019).

Nos casos de resistência aos macrolídeos e falha terapêutica com outros ATM, a intervenção cirúrgica e a administração parenteral prolongada de aminoglicosídeos costumam ser a estratégia clínica de escolha (SHIRAIISHI, 2002; LU, 2019). As diretrizes recentes da *British Thoracic Society* recomendam a adição de outro ATM, como isoniazida, moxifloxacina ou AMI em nebulização (HAWORTH, 2017).

Em um estudo observacional que incluiu 237 pacientes tratados por pelo menos 18 meses, 122 (51,5%) pacientes usaram tratamento (≥ 6 meses) com um macrolídeo, RIF e EMB, 58 (24,5%) apenas EMB e macrolídeo, 32 (13,5%) RIF e macrolídeo e, 25 (10,6%) mantiveram apenas macrolídeo. Agentes injetáveis foram administrados a 24 pacientes (10,1%), incluindo estreptomicina (18 pacientes) e AMI (6 pacientes). A conversão de cultura foi alcançada em 190 de 237 (80,2%) pacientes após uma mediana de 1,7 meses de tratamento, e a cura microbiológica foi alcançada em 129 de 177 (72,9%) pacientes que completaram o tratamento. No entanto, entre os 129 pacientes que obtiveram cura microbiológica, 16 pacientes (12,4%) tiveram uma reinfecção (KIM, 2019).

Pacientes que usaram tratamento ≥ 6 meses com EMB, RIF, ou ambos, com macrolídeo, tiveram maior probabilidade de conversão de cultura em comparação com aqueles que usaram macrolídeo em monoterapia. O uso de EMB e RIF ou o uso de EMB com macrolídeos foi associado a maiores taxas de cura microbiológica, enquanto a manutenção de RIF com macrolídeos não teve bons resultados. O estudo mostrou que a manutenção do EMB foi mais fortemente associada à cura microbiológica do que a RIF (KIM, 2019). O EMB inibe a arabinosiltransferase e bloqueia a síntese de

arabinogalactana, que faz parte da parede micobacteriana, com esse mecanismo, o efeito sinérgico do EMB é esperado quando usado com outros agentes antimicobacterianos (HEIFETS, 1986; JADAUN, 2007; KIM, 2019).

Em relação à frequência do tratamento, as diretrizes da ATS / IDSA preconizam o tratamento intermitente, que envolve a administração de ATM por via oral três vezes por semana, em pacientes com a forma bronquiectásica nodular não cavitária da DP-CMA. Para pacientes em estado grave ou aqueles com a forma bronquiectásica nodular cavitária da DP-CMA, aqueles com recidiva e, aqueles com a forma fibrocavitária da DP-CMA, o tratamento diário é recomendado, porque o tratamento intermitente para esses pacientes é menos eficaz (GRIFFITH, 2007).

Nas diretrizes da British Thoracic Society (BTS), o tratamento intermitente três vezes por semana também é recomendado para pacientes com DP-CMA leve sem sinais de cavidade, no entanto, o tratamento diário é recomendado para pacientes com condição grave. O tratamento intermitente é considerado mais tolerável do que o tratamento diário e sua eficácia pode ser semelhante à do tratamento diário em pacientes com a forma bronquiectásica nodular não cavitária da DP-CMA (HAWORTH, 2017).

Em relação a outras drogas usadas recentemente para tratar DP-CMA, um estudo internacional de fase III investigou a inalação lipossomal de AMI (ALIS) em adição ao tratamento recomendado pela ATS / IDSA e comparou os resultados com os pacientes tratados com o esquema tradicional, em pacientes com DP-CMA refratário, usando como critério de valoração primário a conversão de cultura em 6 meses de tratamento. Significativamente mais participantes que receberam ALIS alcançaram conversão de cultura (29%) em comparação com o regime ATS / IDSA sozinho (9%) (HOY, 2021).

Os eventos adversos mais comuns foram relacionados às vias aéreas e ocorreram mais em pacientes tratados com ALIS (87%), entre estes, o 17% dos pacientes tratados resultaram na descontinuação do ALIS, em comparação com o regime ATS / IDSA (50%). Uma revisão do tratamento baseado em guias da ATS/ITSA e a British Thoracic Society, junto com um ensaio clínico de fase II e outro de fase III, demonstrou que ALIS aumenta as taxas de conversão de cultura quando se adiciona aos esquemas terapêuticos em pacientes com DP-CMA difícil de tratar e com resistência a outros fármacos. Porém, o

uso de ALIS se associou com altas taxas de reações adversas pulmonares e auditivas, mas um baixo risco de reações adversas renais. ALIS pode ser uma opção de tratamento eficiente em idosos com risco de nefrotoxicidade (GOLIA, 2020). Cabe destacar que a terapia com ALIS pode penetrar nos biofilmes e aumentar a captação de AMI pelos macrófagos alveolares (PETERSEN, 1996; GRIFFITH, 2015; AUSTIN, 2020; HOY, 2021; RUBINO, 2021).

A clofazimina é um ATM utilizado no tratamento da hanseníase e também tem demonstrado boa atividade contra o CMA, sendo mais eficaz contra *M. intracellulare* do que *M. avium*. Uma revisão retrospectiva mostrou taxas mais altas de conversão de cultura em pacientes com DP-CMA tratados com a adição de clofazimina a um macrolídeo e EMB (100%) em comparação com aqueles tratados com RIF em adição a um macrolídeo e EMB (71%) (MCGUFFIN, 2017)

Finalmente, a bedaquilina, uma diarilquinolina recentemente licenciada para o tratamento da TB-MDR, também mostrou forte atividade contra o CMA *in vitro* (VESENBECKH, 2017; BROWN-ELLIOTT, 2017). Um estudo usando bedaquilina em pacientes com DP-CMA mostrou uma resposta clínica e microbiológica favorável na maioria dos pacientes, embora não tenha alcançado a conversão de cultura. A bedaquilina pode causar prolongamento do intervalo QT e outras toxicidades e seu papel no tratamento de infecções refratárias por MNT ainda não foi definido (PHILLEY, 2015).

A escolha do tratamento adequado para DP-CMA deve ser acompanhada pela avaliação da susceptibilidade aos ATM. Entre os métodos disponíveis para a determinação de isolados sensíveis e resistentes aos diferentes ATM entre os membros do CMA, o CLSI sugere a utilização do método microdiluição em caldo Mueller-Hinton e o método de proporção de Löwenstein-Jensen como o método padrão ouro para a determinação da CMI para os ATM CLA e AMI (WOODS, 2011; WOODS, 2018). No entanto, estudos experimentais têm avaliado o desempenho da técnica de REMA (*Resazurin Microtiter Assay*) para avaliar a CMI em micobactérias.

Palomino *et al.*, (2002) comparou o método REMA com o método de proporção de Löwenstein-Jensen na determinação da CMI para RIF e isoniazida, em 80 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, mostrando que 98% dos isolados resistentes a RIF pelo

método de proporções, também mostraram resistência pelo método REMA. O método REMA, demonstrou uma excelente capacidade para diferenciar isolados resistentes e suscetíveis (PALOMINO, 2002).

Jaduan *et al.*, (2007) comparou o método REMA com o método de proporção de Löwenstein-Jensen e o método de diluição em ágar, em isolados clínicos de *M. avium* e *M. tuberculosis*. O método REMA mostrou sensibilidade de 96,7%, especificidade de 100% e precisão de 98% na determinação da CMI para *M. tuberculosis*, quando comparado com os resultados do método da proporção de Löwenstein-Jensen. Por outro lado, as CMI determinadas por REMA para *M. avium* foram menores do que aquelas determinadas pelo método de diluição em ágar, sendo estas mais próximas com as concentrações máximas de EMB alcançadas no soro, indicando que os valores da CMI determinados por REMA podem ser correlacionados com mais precisão com as concentrações plasmáticas do EMB alcançáveis (JADUAN, 2007).

Miyata *et al.*, (2013) comparou o método REMA com o BACTEC MGIT 960, considerado como padrão ouro na determinação da CMI em *M. tuberculosis* para quatro ATM (EMB, RIF, estreptomicina e isoniazida). Neste estudo, o método REMA teve resultados concordantes com o BACTEC MGIT 960 para todos os ATM, exceto com o EMB (MIYATA, 2013).

Ramis *et al.*, (2015) avaliou também o método REMA para a determinação da CMI para oito ATM, AMI, cefoxitina, ciprofloxacina, CLA, doxiciclina, linezolida, moxifloxacina e trimetropim-sulfametoxazol, em 76 isolados clínicos de micobactérias de rápido crescimento (18 diferentes espécies). A comparação dos resultados do REMA com os obtidos pelo método padrão de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, mostrou um alto nível de concordância entre esses dois métodos. Neste estudo, a utilização do método REMA representou uma excelente alternativa na determinação da CMI em micobactérias de rápido crescimento, dado que os resultados podem ser lidos de forma confiável e com maior facilidade e rapidez do que com o método Mueller-Hinton clássico, que avalia a turbidez na cultura (RAMIS, 2015).

Mais recentemente Martin *et al.*, (2020) avaliou os ATM de segunda linha etionamida, monossulfato de canamicina, sulfato de capreomicina, ofloxacina e ácido

para- aminossalicílico, com 150 isolados clínicos de *M. tuberculosis* pelo método REMA, e comparou os resultados com o método de proporção de Löwenstein-Jensen. Neste estudo se encontrou uma concordância plena entre os dois métodos na determinação da CMI para os ATM avaliados. A especificidade foi de 100% para os cinco ATM, enquanto a sensibilidade variou de 96,8 a 100%. Sendo assim, o método REMA se mostrou eficiente, mais rápido e mais barato, na determinação de isolados de *M. tuberculosis* resistentes a ATM de segunda linha (MARTIN, 2020).

2.9. Resistências aos Antimicrobianos

Apesar da disponibilidade de ATM para o tratamento de infecções, isolados clínicos pertencentes ao grupo CMA vêm apresentando altas taxas de resistência aos ATM utilizados. A resistência pode ser adquirida ou intrínseca (PHILALAY, 2004; PARK, 2019; MORIMOTO, 2016). A resistência adquirida é ocasionada principalmente pela exposição prévia aos ATM e envolve mutações em seus sítios alvo de ação. Exemplos disto, são mutações pontuais no domínio V do gene 23S rRNA em membros do CMA, que conferem resistência aos macrolídeos. Neste caso, mutações pontuais de adenina (A) → guanina (G) ou citosina (C) na posição 2058 ou 2059 (numeração baseada no genoma de *Escherichia coli*), estão associadas a altos níveis de resistência fenotípica, enquanto mutações pontuais de A → timina (T) na posição 2058, relacionam-se com resistência de baixo nível (JAMAL, 2000; PFISTER, 2004; GRIFFITH, 2006).

As mutações que conferem resistência aos macrolídeos tem sido analisadas em diversos estudos. Destacam-se dois estudos realizados em diferentes períodos por Griffith *et al.*, (2006) e Moon *et al.*, (2016) que analisaram isolados de pacientes com DP-CMA resistente à CLA, especialmente isolados de *M. avium* e *M. intracellulare*. Ambos detectaram presença de mutações pontuais no aminoácido adenina na posição 2058 ou 2059 do gene 23S rRNA em 96% dos isolados avaliados (49/51 e 27/28). Além disso, resultados semelhantes foram detectados quando analisada a mudança de base do aminoácido nessas duas posições, ou seja, ambos estudos, detectaram uma maior proporção de mudança de base de A → G, seguida de A → C, e em menor proporção de

A → T, o que pode relacionar estes isolados a um alto nível de resistência a CLA (GRIFFITH 2006; MOON, 2016).

A rifabutina e a RIF se ligam à subunidade β da RNA polimerase, evitando a produção de transcritos de RNA nascentes (SURESH, 2020). O gene *rpoB* em procariotos codifica a subunidade β , e mutações dentro desse gene resultam em um aumento do nível de resistência aos antibióticos RIF em várias bactérias (GOLDSTEIN, 2014; ZHANG, 2019). Em CMTB, as mutações nos nucleotídeos 1276-1356 do gene *rpoB*, denominada região central de 81 bp, estão associadas à resistência à RIF (ZHANG, 2019)

Em um estudo com 32 isolados clínicos de CMA, nenhuma mutação foi encontrada na região central de 81 pb do gene *rpoB*. No entanto, foi detectada resistência à RIF, com uma mutação pontual de G → A, no nucleotídeo 1631, levando à substituição de Glicina → Aspartato em 544 no gene *rpoB* do lado da região de 81 bp em todos os isolados clínicos. Além disso, uma das cepas resistentes à RIF possuía uma mutação C → T que resultou em uma substituição de Histidina → Tirosina em 445 também dentro da região de 81 bp. Por fim, quando o gene *rpoB* da referida cepa resistente à RIF foi inserido em *M. smegmatis*, tornou-se resistente à RIF (OBATA, 2006).

Por sua vez, Beckler *et al.*, (2008) descreveu uma cepa de *M. avium subsp. paratuberculosis* resistente à RIF com uma mutação na posição 1367 de C → T no gene *rpoB* que causou uma mudança do aminoácido Treonina → Isoleucina em 456, localizado na região central de 81 bp do gene *rpoB*. Além disso, uma cepa resistente à RIF tinha uma mutação na posição 1442 de T → C no gene *rpoB*. O autor conclui que mutações no gene *rpoB*, mesmo mutações de alteração de um único aminoácido, resultam em resistência a RIF (BECKLER; 2008).

O EMB, é um dos ATM que compõe o tratamento básico para a TB e atua interferindo com a polimerização do arabinogalactano e do lipoarabinomanano interferindo com a síntese de da parede celular (GOUDE, 2009; LEE, 2020). A arabinosil transferase, codificada por *embB*, foi proposta como alvo de EMB em CMTB e *M. avium* (BELANGER, 1996).

No CMTB, o gene *embB* é organizado em um operon de 10 kb com os genes *embC* e *embA* chamados *embCAB*, mutações no operon *embCAB*, particularmente *embB*, são responsáveis pela resistência a EMB. Mutações em *embCAB* resultaram em MICs de 7,5 a 50 µg / ml e mutações no códon 306 em *embB* é uma das mais frequentes (>68%) em CMTB, tornando-se a região determinante da resistência ao EMB. No entanto, cerca de 35% das cepas resistentes a EMB não tem mutações no operon, sugerindo que pode haver outros mecanismos de resistência a EMB (TELENTI, 1997; LEE, 2004; MOURE, 2014; RAMAZANZADEH, 2016).

Em um estudo realizado por Armas *et al.*, (2016), uma cepa de *M. avium* subsp. *hominissuis* apresentou resistência a EMB associada a mutação no gene *embB*. A sequência de nucleotídeos de 3214 pb resultante foi comparada com *M. avium* subsp. *avium*, a correspondência mais próxima encontrada foi com os genes *EmbR*, *EmbA* e *EmbB* de *M. avium*, o gene *EmbR* tem função reguladora (número de acesso U66560), relatando assim uma nova mutação sem sentido no códon 589 (G589R) (ARMAS; 2016).

A AMI é um importante ATM utilizado no tratamento da DP-CMA, principalmente em pacientes que apresentaram resistência aos macrolídeos e os que apresentam a forma de fibrocavitária da DP-CMA, porém, a toxicidade e os eventos adversos desse ATM, incluindo a perda auditiva, têm limitado seu uso principalmente em pacientes idosos (BROWN-ELLIOTT, 2013; SHIRLEY, 2019; SHULHA, 2019). O mecanismo de ação da AMI é inibir a síntese de proteica por ligar-se ao *rRNA* na subunidade ribossômica, mutações no gene *rrs* que codifica o 16S rRNA estão associadas a um alto nível de resistência à AMI em isolados clínicos de CMTB (SHULHA, 2019; ZWEIJPFENNING, 2019; KIM, 2021).

Para elucidar as mutações envolvidas de resistência à AMI, Brown *et al.*, (2013) realizou uma análise de mutação nos isolados com CMI > 64 µg / ml, os quais tinham uma mutação A → G na posição 1408 do gene 16S rRNA. As informações clínicas de cinco desses dez isolados indicaram que todos haviam recebido terapia anterior prolongada (>6 meses), quatro dos quais haviam sido tratados com AMI. Por outro lado, nenhuma mutação foi detectada no gene 16S rRNA em isolados com CMI ≤ 64 µg/mL na mutação 16S rRNA (BROWN-ELLIOTT, 2013).

Em outro estudo, Renvoisé *et al.*, (2014) avaliou 277 isolados de *M. avium* e 229 isolados de *M. intracellulare* de pacientes com DP-CMA, dos quais 186 isolados de *M. avium* e 154 de *M. intracellulare* não tinham sido tratados previamente com ATM e, nos quais nenhuma cepa resistente à AMI foi detectada. Porém, entre os pacientes com história de tratamento com ATM prévio, 5 dos 59 isolados de *M. avium* (8%), apresentaram resistência à AMI, destes, 4 tinham CIM > 64 µg / ml e continham uma mutação A → G na posição 1408 no gene 16S rRNA. Em contraste, entre os 45 isolados de *M. intracellulare* de pacientes com tratamento anterior, nenhum isolado resistente à AMI foi identificado (RENVOISÉ, 2014).

Além da resistência adquirida, à resistência intrínseca tem sido postulada como um importante fator envolvido na redução da atividade antimicrobiana no tratamento de infecções pelo CMA, o que está possivelmente relacionada com a parede celular, que é circundada por uma cápsula de polissacarídeos, proteínas e uma pequena quantidade de lipídios ligados, além da produção de enzimas, que degradam ou inativam ATM (MDLULI, 1998; ALDERWICK, 2015; DAFFÉ, 2015; NASIRI, 2017) e, por fim, com o efluxo de ATM através de proteínas transportadoras, também conhecidas como bombas efluxo (RODRIGUES, 2009).

O mecanismo de efluxo, ubíquo na natureza, tem sido identificado em eucariotos e procariotos (NIKAIDO, 2009). Embora esteja normalmente ligado às funções normais da célula, algumas vezes por similaridades como polaridade e energia livre o mecanismo de efluxo pode transportar compostos prejudiciais às células bacterianas, como por exemplo, os ATM, diminuindo a concentração intracelular dos mesmos e sua atividade terapêutica (BLANCO, 2016; DU, 2018). Além de uma expressão fisiológica basal, genes que codificam bombas de efluxo podem apresentar uma sobreexpressão por stress ambiental (por exemplo, presença de ATM, alteração de pH, estresse oxidativo) e mutações na região promotora ou em genes que codificam reguladores transcricionais (RODRIGUES, 2009).

Previamente, a análise genômica de isolados clínicos de pacientes infectados com *M. avium* e *M. intracellulare*, demonstrou a presença de diversos genes que codificam possíveis bombas de efluxo, pertencentes a quase todas as famílias de transportadores conhecidas: *ATP-binding cassette* (ABC), *Major Facilitator Superfamily* (MFS),

Resistance Nodulation Division (RND) e *Small Multidrug Resistance* (SMR) (RODRIGUES, 2009). Entre as bombas de efluxo já caracterizadas no CMA estão a MAV_1406 (MF), MAV_1695, e a MAV_3306 (ABC), todas, até o momento, relacionadas a fenótipos de resistência de baixo nível (SCHMALSTIEG, 2012).

No entanto, cabe destacar, que exposições prolongadas a dose sub-terapêuticas de ATM, podem induzir uma alta expressão destes genes, como resposta ao estresse do ATM, sendo assim, o efluxo pode ser considerado o primeiro passo na aquisição de resistência de alto nível. Portanto, a presença de bombas de efluxo e os níveis mais altos de resistência devido a mutações cromossômicas podem não ser mecanismos dissociados, mas sim eventos moleculares articulados em um mesmo processo (SCHMALSTIEG, 2012).

Adicionalmente, estudo realizado com isolados clínicos de outra MNT, o CMABS, fornece evidências de que a atividade do efluxo é uma característica intrínseca de CMABS, e a sob expressão das bombas de efluxo tem uma forte contribuição para o surgimento da resistência à CLA (VIANNA, 2019).

Com base na capacidade das bombas de efluxo de transportar diferentes compostos passiva ou ativamente através da membrana celular contra o gradiente de concentração, ensaios fluorimétricos, os quais permitem a detecção e quantificação do acúmulo intracelular de um substrato fluorescente, como o brometo de etídio (BrEt), são propostos como um método fenotípico sensível para caracterizar sistemas de efluxo intrínseco em cepas bacterianas. Na presença de um inibidor do efluxo (IE), pode-se avaliar a atividade aumentada do efluxo, que têm sido correlacionadas com uma relevante resistência a ATM clinicamente (VIVEIROS, 2010).

Considerando que o mecanismo de efluxo é associado com a resistência aos ATM, sua inibição emerge como uma valiosa estratégia antimicrobiana. Neste sentido, a busca por compostos que possam ser associados aos ATM para inibir o mecanismo de efluxo torna-se fundamental (RODRIGUES, 2008; BROWN, 2015; FELICETTI, 2019). Diversos IE clássicos como tioridazina (TZ), clorpromazina (CPZ), VP e reserpina (RP), têm demonstrado ter boa atividade inibitória *in vitro* do mecanismo de efluxo em cepas do CMA e em outros microrganismos como, por exemplo, CMTB, *E. coli*, *Acinetobacter*

baumannii (VIVEIROS, 2003; RODRIGUES, 2008; RODRIGUES, 2009; MACHADO, 2012; BROWN, 2015; RUTH, 2020). Embora estudos avaliando diferentes IE tenham demonstrado atividade inibitória do mecanismo efluxo *in vitro*, estes ainda não são utilizados na prática clínica, pois a dose necessária para inibir o efluxo de ATM geralmente está acima da considerada segura sob o ponto de vista de toxicidade (LI, 2015).

A avaliação de IE nos estudos tem avançado, previamente os IE clássicos VP e TZ já demonstraram desempenho na inibição do efluxo em CMA. VP é conhecido por ser um inibidor dos canais de cálcio e, na prática clínica é utilizado para tratar problemas como angina, hipertensão e arritmias cardíacas (RODRIGUES, 2009; RODRIGUES, 2008; BOXBERGER, 2014). Foi relatado que o VP restaura parcialmente a atividade *in vitro* de RIF, isoniazida, EMB, ofloxacina, estreptomicina e os novos ATM antituberculosos bedaquilina e clofazimina em cepas de CMTB (CHEN, 2018). Assim como, o papel de VP na reversão da resistência à tetraciclina, eritromicina, EMB, norfloxacin, estreptomicina e cloranfenicol também foi demonstrado em *M. smegmatis* (CHOUDHURI, 2002). Por outro lado, estudos mostraram que VP é um forte IE de BrEt em micobactérias (GUPTA, 2014; PULE, 2016; VIANNA, 2019; AMARAL, 2020; RINDI, 2020).

Apesar dos vários resultados de VP como IE em micobactérias, Chen (2018) mostrou que, na realidade, VP não afeta a captação intracelular da droga em CMTB inibindo diretamente as bombas de efluxo, mas alterando indiretamente a função da bomba de saída ao interferir com energia da membrana. No entanto, as concentrações de VP necessárias para atingir a atividade bactericida contra CMTB são muito altas e provavelmente tóxicas para as células humanas (CHEN, 2018).

O outro IE clássico testado, TZ, é um antipsicótico da família das fenotiazinas, que também possui atividade antimicobacteriana *in vitro* e *in vivo*. No CMTB, o TZ atua como IE inibindo os canais iônicos, bloqueando a saída do ATP ou pela força motriz do próton, necessária para o transporte do substrato. Além de seu papel como IE, o TZ também melhora a eliminação de micobactérias dos macrófagos por meio da inibição dos canais de potássio e cálcio, o que provoca diminuição do pH do fagolisossomo. O TZ foi usado *in vivo* em combinação com outros ATM em pacientes com TB-XDR. No entanto, apesar

de seu uso, suscita preocupações devido aos efeitos secundários adversos no sistema nervoso central e à cardiotoxicidade (KRISTIANSEN, 2015).

Neste sentido, além da avaliação desses IE clássicos, recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que o ácido úsnico (AUS), composto natural derivado de líquens (INGOLFSDOTTIR, 2002), tem atividade inibitória do mecanismo de efluxo em cepas de CMAB (RAMIS, 2018). Compostos semissintéticos, como os derivados de tetrahidropiridinas, também têm sido estudados, já que possuem propriedades importantes, como por exemplo, a regulação de fluxo de íons de cálcio (TAYLOR, 2000). A eficiência do derivado de tetrahidropiridinas, NUNL2 (2,2,2-trifluoro-1-(1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-il) etanona) como IE em *E. coli*, já foi demonstrada através de análises *in vitro* e *in silico* (SILVA, 2017). Além disto, este composto também apresentou boa atividade na inibição do mecanismo de efluxo frente a isolados do CMAB (VIANNA, 2019).

Considerando esta breve revisão, destaca-se a importância de caracterizar o papel do mecanismo de efluxo na resistência aos ATM em cepas do CMA, bem como avaliar possíveis candidatos a IE que possam ser utilizados na prática clínica.

3. HIPÓTESES

a) O mecanismo de efluxo está relacionado com a resistência aos ATM em membros do CMA.

b) Compostos dissimilares quimicamente, naturais ou sintéticos, como o ácido úsnico e o derivado de tetrahidropiridina, podem atuar como inibidores do efluxo de ATM em membros do CMA

4. JUSTIFICATIVA

As infecções causadas por membros do CMA são um problema emergente em saúde pública. Afetam principalmente a pacientes imunodeprimidos, com doenças pulmonares de base, susceptibilidades genéticas ou outros fatores relacionados com a integridade da estrutura pulmonar. Além disso, pela sua característica de ubiquidade, a presença de membros do CMA dificulta os processos de controle de redes de distribuição de água e materiais e superfícies de uso hospitalar.

O diagnóstico é dificultado pela similaridade das características microscópicas dos membros do CMA com outras micobactérias, bem como compartilha sinais e sintomas clínicos com a TB ou com outras micobacterioses. Apesar da disponibilidade de diferentes ATM para o tratamento destas infecções, o tratamento é longo e os relatos de abandono e falhas terapêuticas são comuns.

Ao contrário do *M. tuberculosis*, as bases moleculares de resistência aos ATM, observada nos membros do CMA, ainda é pouco conhecida.

O efluxo tem sido descrito em diversos microrganismos, inclusive micobactérias, como um mecanismo relacionado à resistência ao ATM. Caracterizar o efluxo em membros do CMA e identificar potenciais IE como adjuvantes na terapêutica antimicrobiana ampliará o conhecimento necessário para o controle destas infecções.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Estudar a relação entre o mecanismo de efluxo e a resistência aos ATM, em espécies do CMA, além de avaliar potenciais compostos inibidores de bombas de efluxo (IE), que possam atuar como moduladores da resistência antimicrobiana nessas espécies.

5.2 Objetivos específicos

- a) Identificar as espécies do CMA através da amplificação de uma região espaçadora transcrita interna, localizada entre os genes 16S e 23S rRNA;
- b) Determinar a Concentração Mínima Inibitória dos antimicrobianos amicacina (AMI), claritromicina (CLA), etambutol (EMB) e rifampicina (RIF) frente a cepas do CMA;
- c) Determinar a Concentração Mínima Inibitória dos Inibidores de Efluxo clássicos, tioridazina (TZ) e verapamil (VP), bem como, do composto natural ácido úsnico (AUS) e do derivado de tetrahidropiridina, NUNL2 frente a cepas do CMA;
- d) Avaliar o efeito modulatório dos inibidores de efluxo TZ e VP, AUS e NUNL2 na atividade antimicrobiana da AMI, CLA, EMB e RIF frente a cepas do CMA;
- e) Avaliar a atividade do efluxo na resistência antimicrobiana frente a cepas do CMA;
- f) Determinar a presença de mutações no gene 23S rRNA que possam ser relacionadas a resistência a CLA frente a cepas do CMA.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo retrospectivo, utilizando 11 cepas pertencentes ao CMA, armazenadas em freezer -20° C, provenientes do Laboratório de Micobactérias do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr, na cidade do Rio Grande – RS; do Núcleo de Tuberculose e Micobactérias do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP; e do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI, Rio de Janeiro, RJ. Estas cepas foram previamente identificadas pelo sequenciamento do gene *hsp65*.

6.2. Cultivo bacteriano

Para a realização dos experimentos, as cepas foram repicadas em meio de cultivo Ogawa-Kudoh preparado de acordo com as instruções do fabricante (Difco Laboratories Inc). Os repiques bacterianos foram realizados a partir da transferência de 200 µL das cepas de estoque, armazenadas a -20°C em meio de cultivo 7H9 suplementado com 25% de glicerol, para um tubo de ensaio contendo meio de cultivo Ogawa-Kudoh. Cepas que não obtiveram crescimento bacteriano após o repique em Ogawa-Kudoh foram repicadas novamente, com a transferência de 200 µL das cepas de estoque, para caldo Mueller Hinton. Os repiques foram incubados a 37°C por sete dias e em seguida utilizados para a realização dos experimentos subsequentes.

6.3. Identificação das cepas

A fim de confirmar o resultado do sequenciamento do gene *hsp65*, feito pelos laboratórios coparticipantes, foi realizado um ensaio de PCR de uma região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) localizada entre os genes *16S* e *23S* rRNA. Esta região varia de tamanho dependendo da espécie de micobactéria. No caso das espécies membros do CMA o produto amplificado corresponde a uma banda de 144 pb.

Adicionalmente, a fim de confirmar a diferenciação entre as principais espécies do CMA, *M. avium* e *M. intracellulare*, foi realizado um ensaio de PCR amplificando o alvo DT1, uma região de 666 pb específica de *M. intracellulare* e, o alvo DT6, amplificando uma região de 187 pb específica para *M. avium* (SIRCILI, 1999; DEVALLOIS, 1996).

6.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de inativação. Para tal, duas alçadas do crescimento bacteriano foram transferidas para um microtubo contendo 300 µL de Tris-EDTA (TE) 1X. Em seguida, para inativação das células, os microtubos foram aquecidos a 80°C por 60 minutos, resfriados em temperatura ambiente e armazenados em freezer, a -20°C, até o momento do experimento.

6.3.2. Amplificação de DNA

Para a identificação da espécie do CMA, foi realizada a PCR do fragmento ITS, que amplifica fragmentos de 144 pb específicos do CMA. Também foi realizada a amplificação dos *primers* DT1 (666 pb) e DT6 (187 pb) por PCR (Tabelas 2, 3, 4).

Tabela 2. Primers usados na identificação de espécies

Região	Primer	Sequência	Tamanho	Referência
ITS	ITSF	5'-CCCTGAGACAAC ACTCGGTC-3	144 pb	Park <i>et al.</i> , 2000;
	ITSR	5'-ATTACACATTTCGATGAACGC-3'		
DT1	IN38	5'-GAACGCCCCTGGCTGGCCATTCACGAAGGAG-3	666 pb	THIERRY, <i>et.</i> <i>al.</i> , 1993
DT6	IN41	5'- GCGCAACACGGTCCGACAGGCCTTCCTCGA-3';	187 pb	THIERRY, <i>et.</i> <i>al.</i> , 1993
	AV6	5'-ATGGCCGGGAGACGATCTATGCCGGCGTAC-3'		
	AV7	5'-CGTTCGATCGCAGTTTGTGCAGCGCGTAC-3'		

Tabela 3. Concentração dos reagentes usados na PCR

Reagentes	Volume (µL) para 1 amostra	
	ITS	DT1/DT6
Água estéril	16	16
Tampão	2,5	2,5
MgCl ₂	0,8	1
DMSO	2	2
PRIMER F	0,5	0,4
PRIMER R	0,5	0,4
dNTP	0,5	0,5
Taq	2	2
DNA	2	2

Tabela 4. Condições da PCR ITS, DT1 e DT6

ITS			DT1 / DT6		
No. Ciclos	Temperatura (°C)	Temp o	No. Ciclos	Temperatura (°C)	Temp o
1	95	10	1	94	10
30	95	1	30	94	1
	57,1	1		61,1	1
	72	1		72	1
1	72	10	1	72	10
1	4	∞	1	4	∞

6.4. Determinação da concentração mínima inibitória

Os experimentos para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos ATB CLA, RIF e EMB e dos IE VER, TZ, AUS e NUNL2, e do substrato de efluxo brometo de etídeo (BrEt), foram realizados em placas de 96 poços, utilizando o método de microdiluição em caldo (BROWN-ELLIOTT, 2018). Uma vez que os IE devem ser utilizados em sua concentração subinibitória em ensaios modulatórios, sua CMI frente às cepas foi determinada. Inicialmente, 100 µL de caldo 7H9 suplementado com glicerol ao 2% e 5% de OADC foram adicionados aos poços teste e 100 µL dos ATM e ou os IE, nas concentrações de uso, foram adicionados ao primeiro poço de suas respectivas colunas e diluídos 1:2.

Por fim, 100 µL do inóculo bacteriano, na escala 0,5 de McFarland, com densidade óptica (D.O.) entre 0,080 e 0,100 nanômetros (nm) e em uma diluição 1:10, foram adicionados aos poços teste. Para o preparo do inóculo, uma alçada do crescimento bacteriano foi adicionada a um tubo contendo pérolas de vidro. Adicionou-se água estéril e homogeneizou-se até se obter uma suspensão visualmente equivalente com a escala 0,5 de McFarland. Cerca de 2 mL da suspensão bacteriana foram transferidos a uma cubeta para que a leitura da D.O., em espectrofotômetro a 626 nm, pudesse ser realizada. Todas as suspensões bacterianas foram ajustadas, com a adição de água estéril ou de colônias bacterianas, até a obtenção de D.O. entre 0,080 a 0,100 nm. A partir da suspensão bacteriana, o inóculo na diluição 1:10 foi preparado utilizando 100 µL da suspensão bacteriana e 900 µL de meio de cultivo 7H9, para cada 1.000 µL de inóculo. Foram adicionados 100 µL do inóculo aos poços teste e as placas foram incubadas a 37°C por 7 dias.

Após a incubação, 30 µL de resazurina 0,02% foram adicionados a cada poço teste e a placa foi incubada por mais 48 horas a 37°C. A resazurina foi utilizada como indicador de viabilidade celular, sendo o crescimento bacteriano evidenciado pela mudança da cor azul (estado oxidado) para a cor rosa (estado reduzido) (RAMIS, 2015). O método REMA foi escolhido para determinar a CMI aos ATM baseados na evidência apresentada por outros autores em trabalhos anteriores.

Considerando-se que o ATM é diluído duas vezes durante o processo: 1º quando é adicionado ao meio de cultivo; 2º quando o inóculo é adicionado a placa, os cálculos para preparo dos ATM foram multiplicados por 4.

Exemplo: Preparo da AMI na concentração de 256 µg/mL:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$C1 = 10 \text{ mg/mL} = 10.000 \text{ µg/mL (Concentração estoque)}$$

$$V1 = \text{Volume da solução estoque que será necessário.}$$

$$C2 = 256 \text{ µg/mL (Concentração desejada)}$$

$$V2 = 1.000 \text{ µL (Volume final desejado)}$$

$$V1 = 10.000 \text{ µg/mL} \times V1 = 256 \text{ µg/mL} \times 1.000 \text{ µL} \times 4$$

$$V1 = 102,4 \text{ mL}$$

Para a interpretação dos resultados, pontos de corte previamente definidos foram utilizados (Tabela 5) (CLSI, 2018). A atividade antimicrobiana do AUS foi verificada pela obtenção de CMI \leq 200 µg/mL (TOSUN, 2004).

Tabela 5. Pontos de corte dos antimicrobianos (mg/mL)

ATM	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE	REFERÊNCIA
CLA	≤ 8	16	>32	GRIFFITH, 2007
AMI	≤ 16	32	≥ 64	BROWN, 2013
RIF	≤ 8	16	>32	OBATA, 2006
EMB	≤ 8	16	≥ 32	JADAUN, 2007

ATM: Antimicrobiano; CLA: Claritromicina; AMI: Amicacina; RIF: Rifampicina; EMB: Etambutol

A CMI foi definida como a menor concentração do ATM capaz de inibir o crescimento bacteriano (PALOMINO, 2002). Para cada placa foram incluídos controles de crescimento (contendo meio de cultura e cepa) e controles negativos (contendo somente meio de cultura). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.5. Fator modulatório dos inibidores de efluxo na atividade antimicrobiana

Para avaliar o papel do mecanismo de efluxo na resistência aos ATM, selecionamos potenciais compostos IE, como VP, TZ, AUS e NUNL2, que já demonstraram atividade inibidora do mecanismo de efluxo anteriormente (RAMIS et al., 2018a). A CMI dos ATM foi determinada com e sem a presença dos IE (VP, TZ, AUS e NUNL2) em sua concentração subinibitória ($\frac{1}{2}$ da CMI).

Inicialmente 100 μ L de caldo 7H9 suplementado com glicerol e 5% de OADC foram adicionados aos poços teste e 100 μ L dos ATM foram adicionados ao primeiro poço de cinco diferentes colunas e microdiluídos. 1^a coluna: CMI do ATM; 2^a coluna: CMI do ATM associado ao IE VP; 3^a coluna: CMI do ATM associado ao IE TZ; 4^a coluna: CMI do ATM associado ao IE AUS, 5^a coluna: CMI do ATM associado ao IE NUNL2. Para garantir a leitura e interpretação dos resultados, foram utilizadas concentrações quatro vezes maiores que a CMI das cepas frente ao respectivo ATM.

Os IE, em suas concentrações subinibitória, foram adicionados às suas respectivas colunas, associados ao inóculo bacteriano. A suspensão bacteriana foi preparada da mesma forma utilizada para os experimentos de determinação da CMI das cepas frente aos ATM e aos IE. O inóculo bacteriano na diluição 1:10 foi preparado e adicionado a primeira coluna teste, para determinação da CMI do ATM da cepa. Em seguida, os IE foram adicionados ao inóculo bacteriano, na concentração subinibitória, e 100 μ L foram adicionados às suas respectivas colunas. Após a adição do inóculo aos poços teste, as placas foram incubadas a 37°C por 7 dias.

Após a incubação, 30 μ L de resazurina 0,02% foram adicionados a cada poço teste e a placa foi incubada por mais 48 horas a 37°C.

Os IE são diluídos quando adicionados a placa contendo meio de cultivo e ATM e devido a isto, os cálculos utilizaram a concentração subinibitória dos IE multiplicada por 2.

Exemplo IE: Preparo do inóculo com IE com CMI de 32 µg/mL:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$C1 = 10 \text{ mg/mL} = 10.000 \text{ µg/mL (Concentração estoque)}$$

V1 = Volume da solução estoque que será necessário.

$$C2 = \text{CMI } 32 \text{ µg/mL} \square \text{ Metade do CMI} \times 2 = 64 \text{ µg/mL}$$

$$V2 = 1.000 \text{ µL (Volume final de inóculo desejado)}$$

$$V1 = 10.000 \text{ µg/mL} \times V1 = 64 \text{ µg/mL} \times 1.000 \text{ µL} \times 2$$

$$V1 = 25,6 \text{ µL}$$

Para a interpretação dos resultados, a CMI dos ATM foi avaliada isoladamente e em associação com os IE. O fator modulatório (FM), que quantifica a redução dos valores de CMI das cepas frente aos ATM na presença do IE, foi calculado através da fórmula:

$$FM = \frac{\text{CMI do ATM}}{\text{CMI do ATM na presença do IE}}$$

Foram considerados significativos $FM \geq 4$ (redução igual ou maior que quatro vezes) (COELHO,2015; GROBLACHER, 2012). Em cada placa foram incluídos controles de crescimento (contendo meio de cultura e cepa), controles negativos (contendo somente meio de cultura) e controles para os IE (contendo cepa associada ao IE na concentração subinibitória, sem ATM). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

6.6. Avaliação da acumulação intracelular do brometo de etídeo

O ensaio para avaliação do sistema de efluxo foi baseado na acumulação intracelular do substrato fluorescente BrEt. O BrEt emite uma fluorescência fraca em solução aquosa e torna-se fortemente fluorescente em ambientes não polares e hidrofóbicos, especialmente quando penetra na parede celular bacteriana e se acumula no espaço periplasmático. Desta forma, após carregar as células bacterianas com BrEt, a intensidade da fluorescência da célula dependerá da atividade do sistema de saída.

Este ensaio foi realizado como previamente descrito por Viveiros *et al.* (2010), com pequenas modificações. Para cada cepa selecionada ao ensaio de acumulação,

primeiramente, preparou-se um inóculo, a partir de uma alçada do crescimento bacteriano adicionada a um tubo contendo pérolas de vidro e água estéril. Esta suspensão foi homogeneizada e mediu-se a D.O. no espectrômetro a 625 nm até que o inóculo atingisse a concentração entre 0,080 e 0,100, o qual equivale a escala 0,5 de McFarland.

Posteriormente, 500 µL desta suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo Falcon de 25 mL, contendo 9.500 µL de 7H9 com 2% de glicerol, suplementado com 5% de OADC e 5 µL de Tween 80. Os tubos foram lacrados para evitar a entrada de oxigênio e incubados a 37°C em agitação constante de 130 RPM por sete dias ou até obter um inóculo na D.O entre 0,800 e 1,00.

Após obter-se a D.O. desejada, os inóculos passaram pelo processo de lavagem para retirar o excesso de meio de cultura. Foi realizada uma centrifugação a 3.800 RPM por 5 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Foram então, adicionados 10 mL de solução tamponada com fosfato (PBS) 1X para ressuspensão do *pellet* e, novamente centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. Logo após, também se descartou o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em torno de 4 mL de PBS 1X. Esta suspensão foi homogeneizada em vórtex e, finalmente a D.O foi medida novamente, até obter-se a concentração de 0,800. Caso fosse necessário ajustar a D.O., foi adicionado PBS1X.

Após a obtenção da suspensão bacteriana com as condições esperadas para o ensaio de acumulação, foram adicionados em uma placa preta de 96 poços 50 µL de cada suspensão bacteriana e 50 µL de uma solução contendo BrEt em diferentes concentrações (0,25 a 2,0 µg/mL), suplementado com glicose a 0,4% (como fonte de energia).

Uma concentração de BrEt foi selecionada para avaliar a capacidade dos IE reter esse substrato no interior das células. Logo então, adicionou-se em uma placa de 96 poços, 50 µL de cada suspensão bacteriana e 50 µL da solução contendo BrEt na concentração selecionada, acrescida de IE na concentração subinibitória ($\frac{1}{2}$ CMI) de cada cepa testada. Também foram adicionados a esta placa poços de controle contendo apenas a solução de BrEt e suspensão bacteriana. Esta técnica de monitoramento da acumulação intracelular do BrEt na ausência e presença de IE, foi realizada utilizando o fluorímetro Infinite F200 (Tecan), nas condições que são conhecidas por aperfeiçoar a saída de bombas de efluxo, ou seja, na presença de uma fonte de energia (glicose), em

pH de 7,0 a 7,4, e incubação a temperatura de 37 °C (VIVEIROS 2010). A intensidade da fluorescência foi adquirida em 60 ciclos de 90 segundos cada, à 37°C. Os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão foram 530 nm e 580 nm, respectivamente. Cada ensaio foi realizado por triplicata.

Desta forma, a partir de um monitoramento em tempo real, foi possível obter-se dados que refletem o grau de fluorescência das células carregadas com BrEt na ausência ou presença dos IE por um período. Esses dados foram então exportados para o Excel e a atividade inibidora dos IE testados em cepas do CMA foi determinada pelo cálculo da fluorescência final relativa (FFR) através da fórmula:

$$FFR = \frac{FR_{tratada} - FR_{não\ tratada}}{FR_{não\ tratada}}$$

A $FR_{tratada}$ corresponde à fluorescência relativa no último ponto da curva de retenção de BrEt na presença do IE; e o $FR_{não\ tratada}$ corresponde à fluorescência relativa no último ponto da curva de retenção de BrEt do poço controle não tratado. A maior diferença entre $FR_{tratada}$ e $FR_{não\ tratada}$, indica o maior grau de acúmulo de BrEt. Um índice de atividade acima de zero indica que as células acumulam mais BrEt na condição tratada (presença do IE) do que na condição não tratada (ausência do IE) (Machado et al 2017).

6.7. Identificação de mutações relacionadas à resistência antimicrobiana

A fim de identificar mutações pontuais nos sítios alvo do ATM CLA, a PCR do gene 23S rRNA foi realizada usando os primers descritos na tabela 6. A extração de DNA foi baseada no método utilizando brometo de cetil trimetil amônio e cloreto de sódio (CTAB/NaCl). Posteriormente os produtos de PCR foram encaminhados para o sequenciamento.

6.7.1. Extração de DNA pelo método CTAB/NaCl

A extração de DNA baseada no método utilizando CTAB/NaCl foi realizada para o sequenciamento de DNA do gene 23S rRNA. O procedimento foi feito seguindo o protocolo:

- a) Transferência de aproximadamente duas alçadas do crescimento micobacteriano para um microtubo contendo 515 μ L de TE 1X;
- b) Inativação das células a 80°C por uma hora e resfriamento em temperatura ambiente;
- c) Adição de 64 μ L de lisozima 10 mg/mL, seguido de vórtex e incubação com agitação por uma hora à 37°C;
- d) Adição de 97 μ L da solução de SDS 10% + Proteinase K 10 mg/mL, seguido de vórtex;
- e) Incubação por 10 minutos a 65°C;
- f) Adição de 128 μ L de NaCl 5M e 128 μ L da solução de CTAB/NaCl previamente aquecida, seguido de vórtex até obtenção de líquido branco leitoso;
- g) Incubação por 10 minutos a 65°C;
- h) Adição de 1030 μ L do clorofórmio isoaminoálcool, seguido de vórtex por 10 segundos;
- i) Centrifugação por 8 minutos a 12.000 rpm;
- j) Transferência da fase aquosa para um microtubo limpo;
- k) Adição de 60% do volume de fase aquosa obtida de isopropanol;
- l) Agitação manual por inversão para precipitar os ácidos nucléicos;
- m) Armazenamento a -20°C *over night*;
- n) Centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm;
- o) Descarte do sobrenadante deixando aproximadamente 20 μ L no pellet;
- p) Adição de 1 mL de álcool 70% resfriado;
- q) Homogeneização por inversão para lavar o DNA;
- r) Centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm;
- s) Descarte do sobrenadante deixando aproximadamente 20 μ L no pellet;
- t) Centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm;
- u) Remoção do sobrenadante restante no pellet invertendo o microtubo;
- v) Secagem do pellet em temperatura ambiente;
- w) Dissolução do pellet com 20 μ L de TE 1X.

Tabela 6. Primers usados na avaliação de resistência

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho	Referência
23S	23S FI	TTTAAGCCCCAGTAAACGGC	420 pb	Jamal et al., 2000
	23S RIII	GTCCAGGTTGAGGGAACCTT		

Tabela 7. Concentrações da PCR do gene 23S rRNA

Reagentes	Volume (µL) para 1 amostra
Água estéril	38,15
Tampão	5
MgCl ₂	1,7
PRIMER F I	0,8
PRIMER R III	0,8
dNTP	1
Taq	0,5
DNA	2

Tabela 8. Condições da PCR do gene 23S rRNA

PCR do gene 23S rRNA		
No. Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4
30	94	1
	55	1
	72	1
1	72	10

6.7.2. Sequenciamento de DNA

6.7.2.1. Purificação do produto de PCR para sequenciamento de DNA

Os produtos da PCR do gene 23S rRNA de cada amostra, foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. Foram adicionados 60 μ L da solução de PEG (polietilenoglicol) 8000/NaCl 2,5M. Os tubos foram incubados por 15 minutos a 37°C e em seguida centrifugados a 15.000 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 μ L de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados novamente a 15.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Os produtos de PCR purificados foram secos em termobloco, ressuspensos com 30 μ L de água estéril e mantidos a 4°C por 48 horas.

6.7.2.2. Quantificação do DNA

Os produtos de PCR purificados foram quantificados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific. Todas as quantificações foram realizadas em duplicata.

6.7.2.3. Preparo final das amostras para o sequenciamento de DNA.

O preparo final das amostras foi realizado conforme orientações da empresa responsável pelo sequenciamento de DNA (ATCGene Análises Moleculares). Para um volume final de 6 μ L, foi adicionado 1 μ L dos *primers*, na concentração de 5 pmol, e as amostras de DNA com concentração entre 30 e 60 ng/ μ L (Tabela 9). Para completar o volume necessário, utilizou-se água ultrapura estéril. Todas as amostras foram secas em estufa a 45°C antes do envio para sequenciamento.

Tabela 9. Preparo das amostras enviadas para sequenciamento de DNA

	Concentração (ng/μL)	Volume para 60 ng/μL	Volume de <i>primer</i>	Volume de água	Volume final
RGMA1	26,84	2,24	1	2,76	6,00
RGMA2	26,21	2,29	1	2,71	6,00
RGMA4	81,41	1,00	1	4,00	6,00
RJMA1	34,04	1,76	1	3,24	6,00
RJMA2	14,77	4,06	1	0,94	6,00
RJMA4	42,9	1,40	1	3,60	6,00
RJMA5	21,47	2,79	1	2,21	6,00
RJMA7	15,39	3,90	1	1,10	6,00
RJMA8	44,69	1,34	1	3,66	6,00
SPMA1	15,13	3,97	1	1,03	6,00
SPMA2	25,52	2,35	1	2,65	6,00

6.7.2.4. Análise dos resultados obtidos no sequenciamento de DNA

A qualidade das sequências obtidas foi analisada utilizando o software Chromas, versão 2.6.6 (Technelysium, Southport, Austrália). O alinhamento das sequências foi realizado através do software BioEdit Sequence Alignment Editor, utilizando as sequências do gene 23S rRNA de uma cepa de referência do *M. avium* (NCBI: NR_103001.2). A análise das sequências foi realizada no site National Center for Biotechnology Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

7. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Área da Saúde (CEPAS) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), sobre o parecer 264/2019 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, atendendo a resolução 466/2012 do Ministério da Saúde.

8. RESULTADOS

8.1. Identificação das espécies do complexo *Mycobacterium avium*

Foram incluídas no estudo 11 cepas pertencentes ao CMA, previamente identificadas pelo sequenciamento do gene *hsp65*, sendo cinco cepas de *M. avium* e seis de *M. intracellulare*.

A fim de confirmar os resultados do sequenciamento do *hsp65*, foi realizada uma PCR do fragmento ITS de 144 pb específico do CMA. A análise da PCR mostrou a presença do fragmento ITS em 100% (11/11) das cepas analisadas.

Para avaliar a utilidade de outros marcadores na discriminação de espécies do CMA, foram amplificadas as regiões DT1 e DT6, previamente descritas como específicas de *M. intracellulare* e *M. avium* respetivamente. A amplificação da DT6 mostrou 100% (5/5) e 67% (4/6) de sensibilidade e especificidade respetivamente, enquanto a amplificação de DT1 mostrou 33% (2/6) e 80% (4/5) de sensibilidade e especificidade, respetivamente (tabela 10).

Em relação a origem das cepas incluídas no estudo, 100% (11/11) são provenientes de amostras de origem pulmonar, entre estas, 82% (9/11) foram coletadas a partir de escarro e 18% (2/11) foram coletadas de lavado bronco alveolar (LBA). Só se tinha informação relacionada ao sexo dos pacientes em 90% (10/11) das cepas, 60% (6/10) eram de sexo feminino e 40% (4/10) eram de sexo masculino. Contou-se com informação disponível de comorbidades em 81% (9/11) das cepas, entre estas, a DPOC foi a mais comum, presente em 67% (6/9) dos pacientes, seguido da infecção pelo HIV em 33% (3/9) dos pacientes.

Tabela 10. Características das cepas avaliadas

Cepa	Origem	Comorbidade	Sexo	<i>hsp65</i>	ITS	DT1	DT6
RGMA1	LBA	HIV	F	<i>M. avium</i>	+	-	+
RGMA2	Escarro	HIV	M	<i>M. avium</i>	+	-	+
RGMA4	Escarro	HIV	NI	<i>M. intracellulare</i>	+	+	-
RJMA1	Escarro	DPOC	F	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-
RJMA2	Escarro	DPOC	M	<i>M. avium</i>	+	-	+
RJMA4	LBA	DPOC	M	<i>M. avium</i>	+	-	+
RJMA5	Escarro	DPOC	F	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-
RJMA7	Escarro	DPOC	F	<i>M. intracellulare</i>	+	+	-
RJMA8	Escarro	DPOC	F	<i>M. intracellulare</i>	+	-	+
SPMA1	Escarro	NI	F	<i>M. intracellulare</i>	+	-	+
SPMA2	Escarro	NI	M	<i>M. avium</i>	+	+	+

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva crônica; LBA: Lavado Bronquioalveolar; HIV: vírus da imunodeficiência humana; F: Feminino; M: masculino; NI: Não informado

8.2. Concentração mínima inibitória

A partir da determinação da CMI para os ATM avaliados, verificou-se que 27% (3/11) das cepas foram resistentes a CLA com valores de CMI ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, também para o EMB, foi detectada resistência em 27% (3/11) das cepas com valores de CMI ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em relação ao perfil de sensibilidade a RIF, 18% (2/11) das cepas apresentaram resistência (CMI = 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por outro lado, nenhuma das cepas avaliadas apresentou fenótipo de resistência a AMI. (Tabela 11).

É importante destacar que 36% (4/11) das cepas apresentaram resistência a pelo menos um dos ATM testados, três identificadas como *M. intracellulare* e uma como *M. avium* pelo sequenciamento do *hsp65*. Destas, apenas uma, a SPMA1 (*M. intracellulare*), apresentou resistência apenas ao EMB; enquanto as outras apresentaram fenótipo de resistência a mais de um ATM, RJMA5 (*M. intracellulare*) resistente a CLA e EMB, enquanto, RJMA1 (*M. intracellulare*) e SPMA2 (*M. avium*) foram resistentes simultaneamente a CLA, EMB e RIF.

Finalmente, a CMI de AUS e NUNL2 variou entre 200 e $\leq 6,25$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ e entre 50 e $\leq 6,25$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11. Concentração Mínima Inibitória dos Antimicrobianos, Inibidores de Efluxo e Brometo de Etídeo frente às cepas avaliadas.

Cepa	CMI dos ATM e IE ($\mu\text{g/mL}$)								
	CLA	RIF	EMB	AMI	VP	TZ	AUS	NUNL2	BrEt
RGMA1	0,0625	2	16	4	512	< 0,5	200	25	2
RGMA2	0,03125	2	8	4	512	< 0,5	50	25	4
RGMA4	8	1	8	4	256	< 0,5	200	25	1
RJMA1	64	64	64	<2	256	16	100	50	4
RJMA2	8	<2	16	<2	16	4	<6.25	<6.25	<2
RJMA4	<2	<2	<4	<2	128	2	6.25	12.5	<2
RJMA5	256	<2	8	<2	128	8	25	6.25	<2
RJMA7	<2	<2	<4	4	256	4	100	50	<2
RJMA8	4	<2	4	<2	256	4	100	25	<2
SPMA1	<2	<2	128	<2	256	4	200	12,5	2
SPMA2	128	64	64	<2	512	32	200	50	2

CMI: Concentração Mínima Inibitória; ATM: Antimicrobiano; IE: Inibidor de efluxo CLA: Claritromicina; RIF: Rifampicina; EMB: Etambutol; AMI: Amicacina; VP: Verapamil; TZ: tioridazina; AUS: Ácido úsnico; NUNL2: 2,2,2-trifluoro-1- (1,4,5,6-tetrahidropiridin-3-il) etanona; BrEt: Brometo de etídeo.

8.3. Mutações relacionadas a resistência a claritromicina

A análise de mutações no gene 23S rRNA relacionadas a resistência a CLA mostrou que 90% (10/11) das cepas avaliadas apresentou a sequência do gene avaliado conservada e, apenas a cepa RJMA5 (*M. intracellulare*) apresentou altos níveis de resistência fenotípica a CLA (256 $\mu\text{g/mL}$), com mutação pontual na posição 2058, com mudança de base de A→T.

8.4. Ensaios modulatórios

Para a análise da relação do efluxo, foi determinado o efeito modulatório dos IE na atividade antimicrobiana, considerando-se significativo $FM \geq 4$ (Tabela 12). O uso combinado dos ATM com o VP mostrou um efeito modulatório na cepa RJMA5 (*M. intracellulare*) com um alto nível de resistência a CLA (256 $\mu\text{g/mL}$). Enquanto a TZ, mostrou um FM significativo em duas das cepas resistentes, RJMA5 (*M. intracellulare*) e SPMA2 (*M. avium*) (128 $\mu\text{g/mL}$).

O AUS apresentou um $FM > 4$ para as duas cepas resistentes a CLA (RJMA5 e SPMA2). Embora o AUS não tenha apresentado FM significativo frente a outra cepa resistente a CLA (RJMA1), tem sido descrito que um $FM = 2$ já indica uma potencial atividade inibidora de efluxo quando são usados produtos naturais (FANKAM, 2017; CABRAL; 2015; WAMBA; 2018). Além disso, o uso combinado de AUS com RIF resultou em um FM significativo para as duas cepas resistentes a este ATM, da mesma forma o AUS apresentou FM significativo para todas as cepas resistentes ao EMB, 100% (3/3).

O NUNL2 mostrou FM significativo para todas as cepas resistentes a CLA com reduções de até 32 vezes do valor da CMI. Quando combinado com RIF, o NUNL2 mostrou um FM significativo em uma das duas cepas resistentes (SPMA2). Por fim, quando combinado com EMB, o NUNL2 mostrou um FM significativo para todas as três cepas resistentes com valores entre 4 e 8.

Destaca-se que AUS ou NUNL2 reverteram a resistência a CLA observada na cepa SPMA2 (*M. avium*).

Tabela 12. Interação entre os inibidores de efluxo e a antimicrobianos frente a cepas do complexo *Mycobacterium avium*.

Cepa	ATM	CMI* ($\mu\text{g/mL}$)	CMI+VP ($\mu\text{g/mL}$)	FM	CMI+TZ ($\mu\text{g/mL}$)	FM	CMI+AUS ($\mu\text{g/mL}$)	FM	CMI+NUNL2 ($\mu\text{g/mL}$)	FM
RJMA1 (<i>M. intracellulare</i>)	CLA	64	64	1	64	1	32	2	16	4
	RIF	64	32	2	32	2	4	16	32	2
	EMB	64	64	1	32	2	4	16	4	16
RJMA5 (<i>M. intracellulare</i>)	CLA	256	64	4	32	8	16	16	32	8
SPMA1 (<i>M. intracellulare</i>)	EMB	64	64	1	64	1	8	8	8	8
SPMA2 (<i>M. avium</i>)	CLA	128	128	1	32	4	4	32	4	32
	RIF	64	64	1	32	2	8	8	16	4
	EMB	64	64	1	32	2	16	4	16	4

ATM: Antimicrobiano; CMI: Concentração Mínima Inibitória; VP: Verapamil; TZ: Tioridazina; AUS: Ácido úsnico; FM: fator modulatório; CLA: Claritromicina; RIF: Rifampicina; EMB: Etambutol

8.5. Ensaios de acumulação do BrEt

Após determinar o FM dos IE, estes compostos foram avaliados para sua capacidade de inibir a atividade de efluxo nas cepas estudadas, através de ensaios de acumulação intracelular do substrato BrEt, uma vez que este composto é capaz de entrar na célula por difusão passiva e pode ser removido desta pelo sistema de efluxo ativo.

Primeiramente, foi determinada a concentração do BrEt em equilíbrio entre o influxo e efluxo. Para isto foram testadas cinco diferentes concentrações de BrEt (0,25 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$). Foi determinada a concentração de BrEt que causou maior acúmulo sem comprometer a viabilidade celular, ou seja, que não excederam $\frac{1}{2}$ da MIC para EtBr (Figura 2).

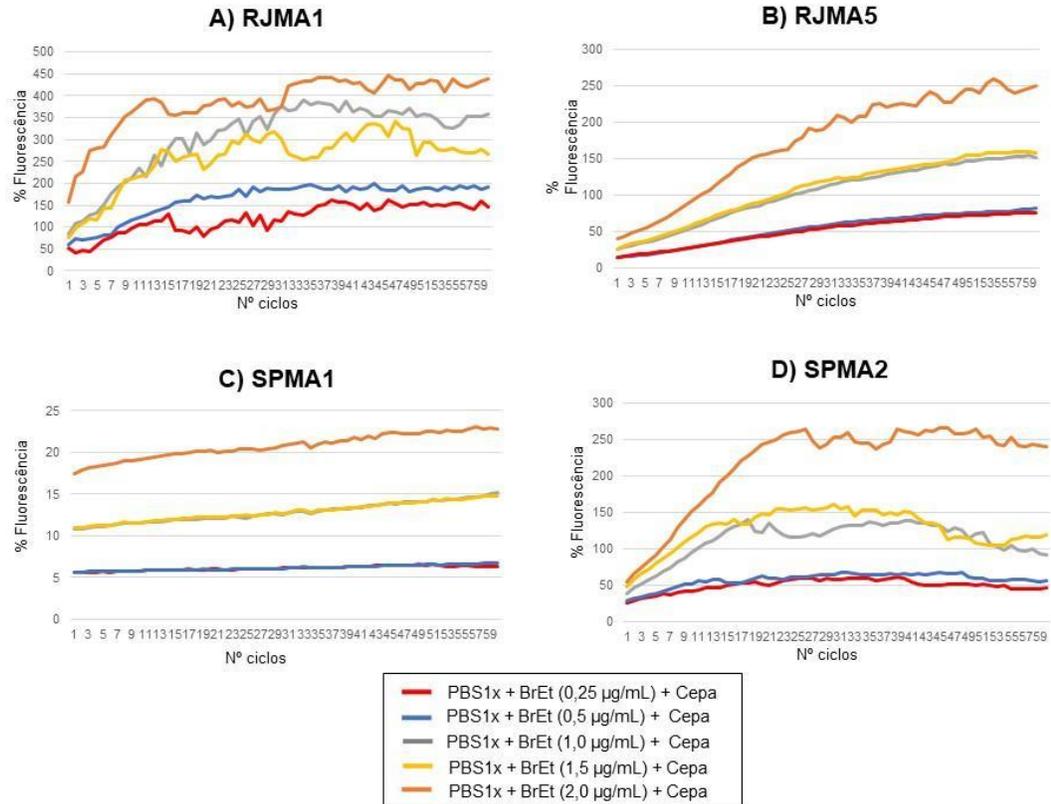


Figura 2. Acumulação de brometo de etídio em diferentes concentrações frente as cepas do complexo *Mycobacterium avium*. (A) RJMA1- *M. intracellulare*, (B) RJMA5 - *M. intracellulare*, (C) SPMA1- *M. intracellulare* e (D) SPMA2- *M. avium*. Tampão Fosfato Salino (PBS) 1X, brometo de etídeo (BrEt)

A seguir foram realizados os ensaios de acúmulo do BrEt nas condições estabelecidas (BrEt 0,5 µg/mL, suplementado com glicose 0,4%) tanto na ausência quanto na presença dos IE. A atividade de efluxo foi quantificada comparando os dados obtidos para a população bacteriana sob condições que permitem o efluxo máximo, ou seja, na ausência do IE, com os dados obtidos na presença do IE, no qual é avaliada a inibição do efluxo celular, ou seja, o substrato acumula mais dentro da célula, logo, o aparelho é capaz de detectar um aumento da fluorescência emitida pelo BrEt ao longo do tempo.

Primeiramente, podemos observar na Figura 3, que as quatro cepas nas condições avaliadas mostraram atividade de efluxo de EtBr. Além disso, os resultados mostram que esta atividade de efluxo pode ser inibida na presença de todos IE avaliados.

A atividade inibidora do efluxo foi calculada a partir da FFR, dos quatro IE testados frente as cepas de CMA, os valores são apresentados na tabela 13. Cabe destacar, que um FFR maior que zero indica que as células acumulam mais BrEt nas condições utilizadas, na presença dos IE, que as células controle (na ausência de IE).

VP e TZ mostraram atividade inibidora frente a todas as cepas avaliadas, interessante o VP mostrou maior atividade inibidora frente a duas cepas identificadas como *M. intracellulare*, RJMA1 e SPMA1, apresentando FFR de 16,6 e 2,6, respectivamente. O TZ, por sua vez, foi o melhor IE para a cepa RJMA5 (*M. intracellulare*), com um FFR de 3,4. No entanto, para a cepa SPMA2, a única *M. avium* resistente, os dois IE clássicos apresentaram um similar desempenho, com valores de FFR de 15,6 para VP e 15,9 para TZ.

Os candidatos a inibidores, AUS e a NUNL2, se mostraram promissores IE frente as cepas resistentes aos ATM. Para o AUS destaca-se uma atividade similar ao TZ e superior a NUNL2 frente a cepa SPMA1 (*M. intracellulare*), com um FFR 1,8. Já NUNL2, mostrou-se o segundo melhor IE frente as cepas RJMA1 (*M. intracellulare*) (FFR=8,2) e RJMA5 (*M. intracellulare*) (FFR=2,7). No entanto, o destaque da atividade da NUNL2 foi frente a cepa SPMA2 (*M. avium*), apresentando um FFR de 20,9.

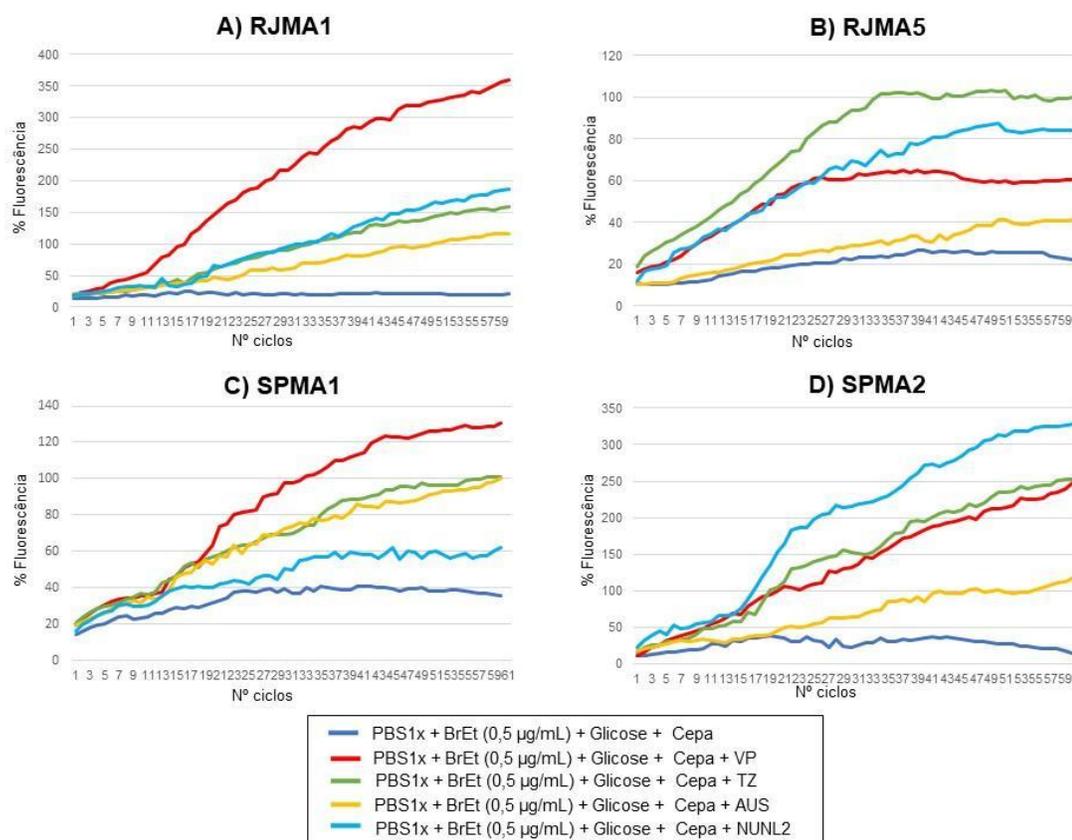


Figura 3. Efeito dos inibidores de efluxo na acumulação de brometo de etídio (0,5 µg/mL) frente as cepas do complexo *Mycobacterium avium*. (A) RJMA1- *M. intracellulare*, (B) RJMA5 - *M. intracellulare*, (C) SPMA1- *M. intracellulare* e (D) SPMA2- *M. avium*. Tampão Fosfato Salino (PBS) 1X, Verapamil (VP), tioridazina (TZ), ácido úsnico (AUS), brometo de etídeo (BrEt).

Tabela 13. Valores da Fluorescência Final Relativa obtidas nos ensaios de acumulação

IE	CEPA			
	RJMA1 <i>M. intracellulare</i>	RJMA5 <i>M. intracellulare</i>	SPMA1 <i>M. intracellulare</i>	SPMA2 <i>M. avium</i>
VP	16,6	1,2	2,6	15,6
TZ	6,7	3,4	1,8	15,9
AUS	4,7	0,8	1,8	6,8
NUNL	8,2	2,7	0,7	20,9

IE: Inibidor de efluxo; VP: Verapamil; TZ: Tioridazina; AUS: Ácido úsnico

9. Discussão

As infecções causadas por membros do CMA, especialmente as DP-CMA, cursam de forma crônica, com sinais clínicos e sintomas inespecíficos e apresentam uma alta taxa de morbimortalidade. Não existe um consenso sobre a melhor terapia a ser empregada para estas infecções, além disso alguns membros do CMA apresentam elevados níveis de resistência intrínseca e adquirida aos ATM mais comumente utilizados no tratamento de outras doenças infecciosas (SHAH, 2016; COWMAN, 2019; LOPEZ-LUIS, 2020; DALEY, 2020; GOPALASWAMY, 2020).

A correta discriminação entre os membros do CMA e outras micobactérias que ocasionam infecções pulmonares, é fundamental na prática clínica. Neste estudo foram utilizadas onze cepas do CMA, isoladas de pacientes com DP-CMA. As cepas foram identificadas previamente através do sequenciamento do gene *hsp65* (HSIAO, 2010; BONA, 2011; JOAO, 2014; SIMNER, 2015; MALEKI, 2017; KIM, 2018). Com a finalidade de considerarmos a acurácia de outros *loci* para identificação dos membros do CMA, foi realizada a amplificação por PCR de uma região espaçadora transcrita interna, localizada entre os genes *16S* e *23S* rRNA (ROTH, 1998), que identificou acuradamente todas as cepas como membros do CMA, mostrando neste estudo, ser um marcador útil na hora de identificar membros do CMA.

Também, a fim de diferenciar as duas espécies mais importantes do CMA, *M. avium* e *M. intracellulare*; utilizando o sequenciamento do *hsp65* como padrão ouro, neste estudo foram amplificadas as regiões DT6 e DT1; sequências de cópia única identificadas no genoma de *M. avium* (DEVALLOIS, 1996; DEVALLOIS, 1997; SIRCILI, 1999), no entanto, estas mostraram baixa acurácia para diferenciação entre estas espécies.

A presença destas sequências em membros do CMA está baseada na discriminação por sorotipos. A amplificação da região DT6 sugere a presença de *M. avium* nos sorotipos 1 a 6, 8 a 11 e 21, enquanto à amplificação da região DT1 sugere a presença de *M. intracellulare* nos sorotipos 2, 3, 7, 12 a 20 e 23 a 25 (DEVALLOIS, 1996; DEVALLOIS, 1997; GARRIGA, 1999; GLODÍC, 2019), no entanto a diferenciação por sorotipo é pouco específica, e não abrangem todas as espécies do CMA, além disso,

com o tempo tem sido descritos até 31 sorotipos, e a presença destas regiões não foi estudada em todos esses sorotipos.

Outras abordagens moleculares como amplificação do gene 16S rRNA, sequenciamento do gene *rpoB* e sequenciamento total do genoma (WGS), tem sido sugerida por apresentar alta acurácia (UCHIYA,2017; QUAN, 2018; CASTEJON, 2018). A identificação de sequências que possam ser usadas como alvos para identificação de espécies do CMA é essencial para o desenvolvimento de novas plataformas diagnósticas.

Além da correta identificação e diferenciação entre membros do CMA, também é importante considerar o perfil de sensibilidade aos ATM mais comuns usados na DP-CMA. A terapia recomendada por especialistas prevê o uso de CLA e azitromicina, combinada com RIF e EMB. Além disso, em casos graves da doença e/ou em pacientes que não respondem ao tratamento, o uso de um aminoglicosídeo, como a AMI pode ser recomendado (GRIFFITH, 2007; WALLACE JR, 2013; HAWORTH, 2017; KWON, 2019; DALEY, 2020; GRIFFITH, 2020).

Apesar da disponibilidade de ATM de diferentes famílias, a falha terapêutica é comum, e pode estar associada a fatores como a toxicidade que alguns ATM geram nos pacientes, assim como a resistência que apresentam alguns membros do CMA aos ATM, o que piora o prognóstico clínico. A resistência clínica aos ATM é o fenótipo de um processo evolutivo que envolve fenômenos genéticos e epigenéticos, entre estes, um importante mecanismo descrito é a extrusão ativa dos ATM através de bombas de efluxo (SCHMALSTIEG, 2012; BLANCO, 2016; DU, 2018).

A extrusão de ATM do interior da célula bacteriana resultante do mecanismo de efluxo desempenha um importante papel na redução da concentração do ATM, conforme já tem sido amplamente descrito tanto em organismos pluri como unicelulares (NASH; 2001; SCHMALSTIEG, 2012).

Em uma terapia de longa duração, como a utilizada no tratamento da DP-CMA é possível que emergam as condições necessárias para a sobre expressão de genes reguladores transcricionais e/ou codificadores de bombas de efluxo, que reduzam a atividade antimicrobiana, permitindo assim a sobrevivência de uma população com baixo

nível de resistência e, que sob estresse e contínuo crescimento possam gerar subpopulações com mutações cromossômicas que confirmam um alto nível de resistência (ROSSI, 2006; LI 2009; RODRIGUES, 2009, SCHMALSTIEG, 2012; BALDWIN, 2019; PAN, 2020; MENICHINI, 2020; RINDI, 2020; PARKER, 2020).

Neste estudo, avaliamos a relação do efluxo com a resistência aos ATM em quatro cepas pertencentes ao CMA. Duas cepas de *M. intracellulare* que apresentaram resistência apenas a um ATM, CLA ou EMB, uma cepa de *M. intracellulare* e uma de *M. avium* que apresentaram fenótipo MDR, sendo ambas resistentes a CLA, RIF e EMB. Através de ensaios modulatórios, avaliamos a presença da atividade de efluxo nestas cepas, estudando a interação dos IE com os ATM.

Os compostos considerados clássicos IE, VP e TZ, apresentaram FM significativo apenas quando testados em combinação com CLA, frente a uma cepa de *M. intracellulare* com resistência de alto nível. Na presença de VP esta cepa reduziu a CMI em até quatro vezes e na presença de TZ a CMI foi reduzida em até oito vezes. Além disso, TZ apresentou um FM significativo frente a cepa de *M. avium*. Estes resultados corroboram estudos anteriores e indicam a possibilidade que as principais espécies de CMA tem um sistema de efluxo que exportam CLA e são inibidos por estes compostos (RODRIGUES, 2009).

Outros compostos, como o AUS e NUNL2 têm mostrado potencial como IE (RAMOS, 2010; SILVA, 2017; RAMIS, 2018; VIANNA, 2019). Os ensaios modulatórios realizados demonstraram que ambos compostos reduziram a resistência aos ATM em quase todas as cepas testadas, com um FM entre ≥ 4 e 32. Cabe destacar que apenas frente a uma cepa de *M. intracellulare*, AUS e NUNL2 apresentaram um FM= 2 em combinação com a CLA e RIF, respectivamente, no entanto, para produtos naturais este FM já indica um potencial atividade inibidora de efluxo (CABRAL; 2015; FANKAM, 2017; WAMBA; 2018).

Neste estudo observou-se que AUS e NUNL2 foram mais eficazes na inibição do efluxo do que VP e TZ. Destacamos também que AUS ou NUNL2 reduziram a CMI de CLA frente a uma cepa de *M. avium*, transformando um fenótipo de resistência para sensível. Em um cenário de alto nível de resistência intrínseca e elevada taxa de falha

terapêutica, associado a escassez de alternativas terapêuticas, os adjuvantes que possam potencializar a ação dos ATM, e mesmo reverter um perfil de resistência, tem destaque no portfólio de desenvolvimento novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas, especialmente na DP-CMA que se mostra resistente a CLA (KADORA, 2015; ADACHI, 2020).

A confirmação da atividade de um sistema de efluxo foi comprovada pelo ensaio de acumulação intracelular do substrato fluorescente BrEt. Nesses ensaios de acumulação, VP e TZ tiveram um ótimo desempenho como IE frente as quatro cepas avaliadas, assim como também já foi demonstrado pelos ensaios de Rodrigues *et al.*, (2009).

Foi observado que frente as cepas de *M. intracellulare*, o VP foi o melhor IE, seguido do TZ e o NUNL2, com uma atividade de IE similar. A atividade do AUS como IE apresentou a menor atividade para todas as cepas, mas frente a uma cepa de *M. intracellulare* apresentou a mesma atividade que o IE clássico TZ. Em relação a única cepa da espécie *M. avium*, o NUNL2 apresentou a melhor atividade de IE, com um RFF de 20,9, o maior valor em nosso estudo nesta cepa, além disso, os IE clássicos também apresentaram um valor de FFR altamente significativo.

Destaca-se que a boa atividade de NUNL2 ocorreu frente às três cepas que apresentaram fenótipo de resistência a CLA, principal ATM do esquema terapêutico nas infecções ocasionadas por membros do CMA. Desta forma, ressalta-se a potencial atividade de inibição do mecanismo de efluxo dos compostos, AUS e NUNL2 frente às espécies de CMA aqui testadas.

O AUS é um composto de origem natural obtido do metabolismo de líquens e tem sido demonstrado atividade antimicrobiana e inibidora de efluxo. Seu mecanismo de ação não é completamente elucidado, no entanto, alguns estudos relatam a capacidade deste composto de atuar alterando a integridade da membrana celular, levando ao rompimento da célula (GUPTA, 2012; GUPTA, 2018). Outros estudos têm sugerido que o AUS pode inibir a síntese de ácido nucleico e interferir com a síntese de ácidos graxos e peptidoglicanos (RAMOS, 2010; CARVALHO, 2016; CIRILLO, 2018).

A atividade antimicrobiana do AUS foi detectada anteriormente em micobactérias, como *M. aurum* (INGÓLFSDÓTTIR, 1998), *M. kansasii*, *M. fortuitum* (RAMOS, 2010) e *M. abscessus* (RAMIS, 2018). Nossos resultados também destacam CMTB uma atividade antimicrobiana do AUS frente a todas as cepas de CMA avaliadas, uma vez que apresentou valores de CMI $\leq 200 \mu\text{g/mL}$ (TOSUN, 2004). Além disso, para duas cepas os valores de CMI do AUS foram ainda menores, $\leq 6,25 \mu\text{g/}$ (ORME, 2001).

Em relação ao uso do AUS como IE, já foi descrita uma potente atividade deste composto natural em CMABS, através de ensaios de acumulação do BrEt (RAMIS, 2018). Neste sentido, considerando estes e os nossos resultados, evidenciamos que o AUS se mostra um promissor candidato a IE, para desenvolver um fármaco com potencialidade de ser utilizado como adjuvante no tratamento de infecção por duas importantes MNT.

Também, ressaltamos os resultados referentes ao composto NUNL2, uma tetrahidropiridina previamente descrita como IE. Estes compostos possuem uma ampla gama de bioatividades descritas e ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (PRACHAYASITTIKUL, 2010). Os resultados deste estudo mostram uma atividade antimicrobiana do NUNL2, com CMI de ≤ 50 para todas as cepas. Ramis *et al.*, (2019), relatou valores de MIC entre 50 e 200 mg /ml para o composto NUNL2 em cepas de CMABS (RAMIS, 2019).

NUNL2 foi previamente descrito como IE da bomba de efluxo AcrB *in vitro* e *in silico* em *E. coli*, e do mecanismo de efluxo em membros do CMAB (SILVA Jr, 2017, VIANNA, 2019). Recentemente, Halicki et al., (2021) avaliou a atividade IE do NUNL2 frente a duas cepas de *M. tuberculosis*. Neste trabalho, o NUNL2 foi capaz de aumentar a sensibilidade da cepa multirresistente aos ATM evidenciando um sinergismo com a rifampicina (HALICKI, 2021).

Finalmente, considerando que a CLA é o principal ATM utilizado no tratamento das infecções causadas pelos membros de CMA, buscamos identificar as mutações canônicas no gene 23S rRNA, relacionadas à resistência à CLA. Nas 11 cepas avaliadas foi encontrada apenas uma mutação, que ocorreu na posição 2058 (A→T) 23S rRNA da cepa RJMA5 (*M. intracellulare*).

É interessante destacar que esta mutação foi previamente descrita como relacionada com resistência em baixo nível a macrolídeos (JAMAL, 2000; PFISTER, 2004; GRIFFITH, 2006). No presente estudo a cepa RJMA5 apresentou altos níveis de resistência a CLA (256 µg/mL). Considerando que o efluxo está relacionado com a resistência aos ATM é possível inferir a possibilidade de que em algumas cepas ocorra uma atividade sinérgica entre o efluxo e a mutação para determinar altos níveis de resistência aos ATM.

Em duas cepas resistentes a CLA que apresentaram o gene 23S rRNA intacto, embora suas CMI tenham sido reduzidas na presença de IE, mantiveram valores que caracterizam a resistência a CLA, sugerindo que outros mecanismos e/ou mutações podem estar relacionado com a resistência a CLA.

Um grande obstáculo para a implementação de IE em combinação com ATM, é devido ao fato de que a modulação de sistemas de efluxo pode ser tóxico devido à multiplicidade de papéis fisiológicos que os IE podem desempenhar nas células humanas. Nesse contexto, a descoberta de compostos que atuem na inibição de bombas de efluxo exclusivas de procariotos pode favorecer o desenvolvimento de fármacos com potencialidade de uso clínico (BHARDWAJ, 2012; KOURTESI, 2013; LUCARINI, 2021).

Estudos de farmacocinética e farmacodinâmica em modelo animal e de toxicidade *ex vivo* poderão permitir o avanço no desenvolvimento de candidatos a IE que possam ser utilizados como adjuvantes na prática clínica.

10. CONCLUSÃO

1. A amplificação da região ITS de 144 pb foi eficiente na identificação de membros do CMA, enquanto a amplificação das regiões DT1 ou DT6, apresentou baixa acurácia para discriminação entre *M. intracellulare* e *M. avium*;
2. O REMA, um teste rápido e de baixo custo, foi útil para identificar isolados do CMA monoresistentes e MDR, bem como avaliar a CMI dos IE;
3. O AUS e a NUNL2 apresentaram atividade antimicrobiana frente a *M. avium* e *M. intracellulare*;
4. O AUS e a NUNL2 também mostraram atividade inibidora do efluxo reduzindo a resistência a CLA, RIF e EMB, e em alguns casos restaurando a sensibilidade terapêutica de *M. avium* e *M. intracellulare*;
5. O fenótipo de resistência a CLA em diferentes níveis, foi observado nos membros do CMA, independentemente da presença de mutações no gene 23S rRNA;

Finalmente, considerando a importância do CMA na etiologia de doenças infecciosas associado a resistência aos ATM destes microrganismos, reforça a necessidade de ampliar o conhecimento sobre as bases moleculares da resistência aos ATM, bem como buscar novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

ABATE, G. et al. BCG Vaccination Induces M. avium and M. abscessus Cross-Protective Immunity. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 10, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00234>

ABOUTALEBI A et al. Primary cutaneous infection by Mycobacterium avium. *Cutis*, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 175–179, 2012.

ABRAHAMS, K. A.; BESRA, G. S. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*, [s. l.], v. 145, n. 2, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182016002377>

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology*, [s. l.], v. 17, n. 1, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>

ADJEMIAN, J. et al. Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in U.S. Medicare Beneficiaries. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 185, n. 8, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201111-2016OC>

ADACHI, Y., et a (2020). Effective treatment for clarithromycin-resistant Mycobacterium avium complex lung disease. *Journal of Infection and Chemotherapy*. doi:10.1016/j.jiac.2020.02.008

AGDESTAIN, A. et al. A comparative study of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. hominissuis in experimentally infected pigs. *BMC Veterinary Research*, [s. l.], v. 8, n. 1, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-11>

AKAHANE, T.; NAKATSUCHI, Y.; TATEIWA, Y. Recurrent granulomatous tenosynovitis of the wrist and finger caused by Mycobacterium intracellulare: a case report. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, [s. l.], v. 56, n. 1, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.03.001>

AKSAMIT, T. R. Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients with pre-existing lung disease. *Clinics in Chest Medicine*, [s. l.], v. 23, n. 3, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(02\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(02)00022-9)

ALCOLEA-MEDINA, A. et al. An improved simple method for the identification of Mycobacteria by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption- Ionization mass spectrometry). *Scientific Reports*, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56604-7>

ALDERWICK, L. J. et al. The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, [s. l.], v. 5, n. 8, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021113>

ALEXANDER, D. C. et al. Emergence of mmpT5 Variants during Bedaquiline Treatment of Mycobacterium intracellulare Lung Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 55, n. 2, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02087-16>

ALTIC, L. C.; ROWE, M. T.; GRANT, I. R. UV Light Inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk as Assessed by FASTPlaque TB Phage Assay and Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 73, n. 11, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.00057-07>

AMARAL, R. C. R. do et al. Is the efflux pump inhibitor Verapamil a potential booster for isoniazid against Mycobacterium tuberculosis? *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, [s. l.], v. 56, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000218309>

AMIR J. Non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis in children: diagnosis and management. *Isr Med Assoc J*, [s. l.], v. 1, p. 49–52, 2010.

ANIM-APPIAH, D. et al. Mycobacterium avium complex tenosynovitis of the wrist and hand. *Arthritis Care & Research*, [s. l.], v. 51, n. 1, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1002/art.20086>

ARMAS, F. et al. Molecular characterization and drug susceptibility profile of a Mycobacterium avium subspecies avium isolate from a dog with disseminated infection.

Journal of Medical Microbiology, [s. l.], v. 65, n. 4, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000221>

ASHIMA K. BHARDWAJ; PRIYABRATA MOHANTY. Bacterial Efflux Pumps Involved in Multidrug Resistance and their Inhibitors: Rejuvenating the Antimicrobial Chemotherapy. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2012. Available at: <https://doi.org/10.2174/157489112799829710>

AUSTIN GOLIA et al. Amikacin Liposome Inhalation Suspension for Mycobacterium avium Complex Lung Disease. [s. l.], v. 4, n. 35, p. 16–170, 2020.

BAI, X. et al. Alpha-1-Antitrypsin Enhances Primary Human Macrophage Immunity Against Non-tuberculous Mycobacteria. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 10, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01417>

BALDWIN, S. L. et al. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, [s. l.], v. 13, n. 2, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007083>

BALGANESH, M. et al. Efflux Pumps of Mycobacterium tuberculosis Play a Significant Role in Antituberculosis Activity of Potential Drug Candidates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 56, n. 5, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.06003-11>

BAMBEKE, F.; PAGES, J.-M.; LEE, V. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibiotic Treatments and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, [s. l.], v. 1, n. 2, 2006. Available at: <https://doi.org/10.2174/157489106777452692>

BANG, D. et al. Mycobacterium arosiense sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, [s. l.], v. 58, n. 10, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65503-0>

BANNANTINE, J. P. et al. Genetic Diversity Among *Mycobacterium avium* Subspecies Revealed by Analysis of Complete Genome Sequences. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 11, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01701>

BARRETTO, A. R. et al. A fatal case of pulmonary infection by *Mycobacterium colombiense* in Para State, Amazon Region, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, [s. l.], v. 85, n. 3, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.011>

BECKLER, D. R. et al. Correlation between *rpoB* gene mutation in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and clinical rifabutin and rifampicin resistance for treatment of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, [s. l.], v. 14, n. 17, 2008. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.14.2723>

BEGGS, M. L.; STEVANOVA, R.; EISENACH, K. D. Species Identification of *Mycobacterium avium* Complex Isolates by a Variety of Molecular Techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 38, n. 2, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.2.508-512.2000>

BELANGER, A. E. et al. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s. l.], v. 93, n. 21, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11919>

BEN SALAH, I. et al. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, [s. l.], v. 59, n. 11, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010637-0>

BEN SALAH, I. et al. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology*, [s. l.], v. 154, n. 12, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/020164-0>

BENGTSSON, D. et al. Mycobacterium chimaera in heater-cooler units used during cardiac surgery – growth and decontamination. *Infectious Diseases*, [s. l.], v. 50, n. 10, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1464204>

BERMUDEZ, L. E. et al. An Animal Model of Mycobacterium avium Complex Disseminated Infection after Colonization of the Intestinal Tract. *Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 165, n. 1, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/165.1.75>

BERMUDEZ, L. E.; WAGNER, D.; SOSNOWSKA, D. Mechanisms of Mycobacterium Avium Pathogenesis. *Inflammation*, Dordrecht, 2001. Available at: https://doi.org/10.1007/978-94-015-9702-9_12

BLANCHARD, J. D. et al. Effective Treatment of Mycobacterium avium subsp. hominissuis and Mycobacterium abscessus Species Infections in Macrophages, Biofilm, and Mice by Using Liposomal Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 62, n. 10, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00440-18>

BLANCO, P. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, [s. l.], v. 4, n. 1, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>

BOHLSON, S. S. et al. Role of Complement in Mycobacterium avium Pathogenesis: In Vivo and In Vitro Analyses of the Host Response to Infection in the Absence of Complement Component C3. *Infection and Immunity*, [s. l.], v. 69, n. 12, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7729-7735.2001>

BONA, M. das G. M. e et al. Análise de restrição enzimática do gene hsp65 de isolados clínicos de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar em Teresina, Piauí. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, [s. l.], v. 37, n. 5, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132011000500010>

BOXBERGER, K. H.; HAGENBUCH, B.; LAMPE, J. N. Common Drugs Inhibit Human Organic Cation Transporter 1 (OCT1)-Mediated Neurotransmitter Uptake. *Drug Metabolism and Disposition*, [s. l.], v. 42, n. 6, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1124/dmd.113.055095>

BOYLE, D. P. et al. Comparison of Clinical Features, Virulence, and Relapse among Mycobacterium avium Complex Species. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 191, n. 11, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201501-0067OC>

BOYLE, D. P.; ZEMBOWER, T. R.; QI, C. Relapse versus Reinfection of Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease. Patient Characteristics and Macrolide Susceptibility. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 13, n. 11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201605-344BC>

BRANDT, L. et al. Failure of the Mycobacterium bovis BCG Vaccine: Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis. *Infection and Immunity*, [s. l.], v. 70, n. 2, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.672-678.2002>

BRENNAN, P. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, [s. l.], v. 83, n. 1–3, 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6)

BRODE, S. K. et al. Pulmonary versus Nonpulmonary Nontuberculous Mycobacteria, Ontario, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 23, n. 11, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2311.170959>

BROWN-ELLIOTT, B. A. et al. In Vitro Activity of Amikacin against Isolates of Mycobacterium avium Complex with Proposed MIC Breakpoints and Finding of a 16S rRNA Gene Mutation in Treated Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 51, n. 10, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01612-13>

BROWN-ELLIOTT, B. A. et al. In Vitro Susceptibility Testing of Bedaquiline against Mycobacterium avium Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 61, n. 2, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01798-16>

BROWN-ELLIOTT, B. A. et al. Semiquantitative Culture Analysis during Therapy for Mycobacterium avium Complex Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 192, n. 6, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201503-0444OC>

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. In Vitro Susceptibility Testing of Tedizolid against Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 55, n. 6, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00274-17>

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WOODS, G. L. Antimycobacterial Susceptibility Testing of Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 57, n. 10, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00834-19>

BULL, T. J.; SHANSON, D. C. Evaluation of a commercial chemiluminescent gene probe system 'AccuProbe' for the rapid differentiation of mycobacteria, including 'MAIC X', isolated from blood and other sites, from patients with AIDS. *Journal of Hospital Infection*, [s. l.], v. 21, n. 2, 1992. Available at: [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(92\)90034-J](https://doi.org/10.1016/0195-6701(92)90034-J)

BUSATTO, C. et al. *Mycobacterium avium*: an overview. *Tuberculosis*, [s. l.], v. 114, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.004>

BUSATTO, C. et al. Nontuberculous mycobacteria in patients with suspected tuberculosis and the genetic diversity of *Mycobacterium avium* in the extreme south of Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20190184>

CABRAL, V. et al. Enhancing activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus*: *Zanthoxylum capense* constituents and derivatives. *Phytomedicine*, [s. l.], v. 22, n. 4, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.02.003>

CALIPPE, B. et al. Chronic Estradiol Administration In Vivo Promotes the Proinflammatory Response of Macrophages to TLR4 Activation: Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *The Journal of Immunology*, [s. l.], v. 180, n. 12, 2008. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.7980>

CAPPELLUTI, E.; FRAIRE, A. E.; SCHAEFER, O. P. A Case of "Hot Tub Lung" Due to *Mycobacterium avium* Complex in an Immunocompetent Host. *Archives of Internal Medicine*, [s. l.], v. 163, n. 7, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinte.163.7.845>

CARNEIRO, M. dos S. et al. Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high tuberculosis incidence setting in Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, [s. l.], v. 44, n. 2, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1590/s1806-37562017000000213>

CARVALHO, I. A. et al. Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Brazilian patients with inflammatory bowel diseases and in controls. *Sao Paulo Medical Journal*, [s. l.], v. 134, n. 1, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2014.8251809>

CASTEJON, M. *et al.* Whole-genome sequence analysis of the *Mycobacterium avium* complex and proposal of the transfer of *Mycobacterium yongonense* to *Mycobacterium intracellulare* subsp. *yongonense* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 6, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002767>

CHANG, C.-L. et al. Different clinical features of patients with pulmonary disease caused by various *Mycobacterium avium*–*intracellulare* complex subspecies and antimicrobial susceptibility. *International Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 98, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.019>

CHATTERJEE, D.; KHOO, K.-H. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [s. l.], v. 58, n. 14, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1007/PL00000834>

CHEN, C. et al. Verapamil Targets Membrane Energetics in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 62, n. 5, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.02107-17>

CHIMARA, E. et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiology*, [s. l.], v. 8, n. 1, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-48>

CHIN, D. P. et al. *Mycobacterium avium* Complex in the Respiratory or Gastrointestinal Tract and the Risk of *M. avium* Complex Bacteremia in Patients with

Human Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 169, n. 2, 1994. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/169.2.289>

CHINEN, L. T. D. Recombinant interleukin-4 treated macrophages, epithelioid cells surrogates, harbor and arrest *Mycobacterium avium* multiplication in vitro. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, [s. l.], v. 47, n. 4, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000400013>

CHITSAZ, M.; BROWN, M. H. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays in Biochemistry*, [s. l.], v. 61, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1042/EBC20160064>

CHRISTENSEN, J. B.; KOEPPE, J. *Mycobacterium avium* Complex Cervical Lymphadenitis in an Immunocompetent Adult. *Clinical and Vaccine Immunology*, [s. l.], v. 17, n. 9, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1128/CVI.00208-10>

CIRILLO, D. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of (+)-usnic acid conjugates. *Archiv der Pharmazie*, [s. l.], v. 351, n. 12, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/ardp.201800177>

CLAEYS, T. A.; ROBINSON, R. T. The Many Lives of Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, [s. l.], v. 200, n. 11, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00739-17>

CLOUD, J. L. et al. Interpretive Criteria for Use of AccuProbe for Identification of *Mycobacterium avium* Complex Directly from 7H9 Broth Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 43, n. 7, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3474-3478.2005>

COELHO, T. et al. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 6, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00330>

COOK, J. L. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *British Medical Bulletin*, [s. l.], v. 96, n. 1, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldq035>

CORTI, M.; PALMERO, D. Mycobacterium avium complex infection in HIV/AIDS patients. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, [s. l.], v. 6, n. 3, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1586/14787210.6.3.351>

COWMAN, S. et al. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, [s. l.], v. 54, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.00250-2019>

COWMAN, S.; LOEBINGER, M. Diagnosis of Nontuberculous Mycobacteria Lung Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 39, n. 03, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1651493>

CROCE, O. et al. Draft Genome Sequence of Mycobacterium vulneris DSM 45247 T. *Genome Announcements*, [s. l.], v. 2, n. 3, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00370-14>

DA SILVA, P. E. A. et al. Efflux as a mechanism for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis : Table 1. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, [s. l.], v. 63, n. 1, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x>

DAFFÉ, M. The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis*, [s. l.], v. 95, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.024>

DALEY, C. L. Mycobacterium avium Complex Disease. *Microbiology Spectrum*, [s. l.], v. 5, n. 2, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0045-2017>

DALEY, C. L.; WINTHROP, K. L. Mycobacterium avium Complex: Addressing Gaps in Diagnosis and Management. *The Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 222, n. Supplement_4, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa354>

DANLEY, J. et al. Normal Estrogen, but Low Dehydroepiandrosterone Levels, in Women with Pulmonary Mycobacterium avium Complex. A Preliminary Study. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 11, n. 6, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201312-422OC>

DAUTZENBERG, B. et al. Activity of Clarithromycin against Mycobacterium avium Infection in Patients with the Acquired Immune Deficiency Syndrome: A Controlled Clinical

Trial. American Review of Respiratory Disease, [s. l.], v. 144, n. 3_pt_1, 1991. Available at: <https://doi.org/10.1164/ajrccm/144.3 Pt 1.564>

GROOTE, M. A. et al. Relationships between Mycobacterium Isolates from Patients with Pulmonary Mycobacterial Infection and Potting Soils. Applied and Environmental Microbiology, [s. l.], v. 72, n. 12, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.00930-06>

DELMAR, J. A.; SU, C.-C.; YU, E. W. Bacterial Multidrug Efflux Transporters. Annual Review of Biophysics, [s. l.], v. 43, n. 1, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022855>

DEVALLOIS, A. et al. Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare. Journal of Clinical Microbiology, [s. l.], v. 34, n. 11, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.34.11.2756-2759.1996>

DEVALLOIS, A. et al. Molecular characterization of Mycobacterium avium complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16S rRNA gene sequencing, and DT1-DT6 PCR. Journal of Clinical Microbiology, [s. l.], v. 35, n. 11, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2767-2772.1997>

DHILLON, S. S.; WATANAKUNAKORN, C. Lady Windermere Syndrome: Middle Lobe Bronchiectasis and Mycobacterium avium Complex Infection Due to Voluntary Cough Suppression. Clinical Infectious Diseases, [s. l.], v. 30, n. 3, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1086/313726>

DIEL, R.; LIPMAN, M.; HOEFSLOOT, W. High mortality in patients with Mycobacterium avium complex lung disease: a systematic review. BMC Infectious Diseases, [s. l.], v. 18, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3113-x>

DOMINICI, S. et al. Involvement of Stat1 in the Phagocytosis of M. avium. Clinical and Developmental Immunology, [s. l.], v. 2012, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/652683>

DOMINICI, S. et al. Selective Killing of *Mycobacterium avium* –Infected Macrophages by Inhibition of Phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription Type 1. *The Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 198, n. 1, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1086/588824>

DONOHUE, M. J. Epidemiological risk factors and the geographical distribution of eight *Mycobacterium* species. *BMC Infectious Diseases*, [s. l.], v. 21, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05925-y>

DU, D. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, [s. l.], v. 16, n. 9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>

DUFFEY, P. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* chromatotypes defined by curvilinear gradient HPLC of mycolic acids. *FEMS Microbiology Letters*, [s. l.], v. 95, n. 1, 1992. Available at: [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90732-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90732-4)

ECKELT, E. et al. FurA contributes to the oxidative stress response regulation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 6, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00016>

ENNA, S. G. et al. Sequencing of hsp65 Gene for Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Environmental and Clinical Sources in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 46, n. 11, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00451-08>

ESPARCIA, O. et al. Lymphadenopathy Caused by *Mycobacterium colombiense*. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 46, n. 5, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01441-07>

ESTEBAN, J.; GARCÍA-COCA, M. *Mycobacterium* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 8, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02651>

EL AMIN, H.-S. H. Identification of Non-tuberculous *Mycobacteria*: 16S rRNA Gene Sequence Analysis vs. Conventional Methods. *Scandinavian Journal of Infectious*

Diseases, [s. l.], v. 32, n. 1, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1080/00365540050164218>

FALKINHAM, J. O. Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous Mycobacteria (NTM). *Current Environmental Health Reports*, [s. l.], v. 3, n. 2, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0086-z>

FALKINHAM, J. O. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiology*, [s. l.], v. 5, n. 6, 2010. Available at: <https://doi.org/10.2217/fmb.10.53>

FALKINHAM, J. O. Reducing Human Exposure to *Mycobacterium avium*. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 10, n. 4, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201301-013FR>

FALKINHAM, J.O. *Mycobacterium avium* complex: Adherence as a way of life. *AIMS Microbiology*, [s. l.], v. 4, n. 3, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.428>

FANKAM, A. G.; KUIATE, J.-R.; KUETE, V. Antibacterial and antibiotic resistance modulatory activities of leaves and bark extracts of *Recinodindron heudelotii* (Euphorbiaceae) against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, [s. l.], v. 17, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1687-2>

FAWZY, A. et al. Genotyping methods and molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, [s. l.], v. 6, n. 2, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.08.001>

FELICETTI, T. et al. Modifications on C6 and C7 Positions of 3-Phenylquinolone Efflux Pump Inhibitors Led to Potent and Safe Antimycobacterial Treatment Adjuvants. *ACS Infectious Diseases*, [s. l.], v. 5, n. 6, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00041>

FERREIRA, C. P. et al. Atypical cutaneous mycobacteriosis caused by *Mycobacterium avium* complex. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 14, n. 3, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702010000300024>

GONÇALVES F, J. M.; RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, J. Síndrome de Lady Windermere. ¿Una entidad exclusiva de mujeres? *Archivos de Bronconeumología*, [s. l.], v. 52, n. 10, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2016.03.005>

FORBES, B. A. Mycobacterial Taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 55, n. 2, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01287-16>

FUJITA, K. et al. Association between *Mycobacterium avium* complex lung disease and serum vitamin D status, antimicrobial peptide levels, and bone mineral density. *Medicine*, [s. l.], v. 97, n. 38, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012463>

FUJITA, K. et al. Genetic relatedness of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex isolates from patients with pulmonary MAC disease and their residential soils. *Clinical Microbiology and Infection*, [s. l.], v. 19, n. 6, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03929.x>

FUJIWARA, N. et al. Structural Analysis and Biosynthesis Gene Cluster of an Antigenic Glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *Journal of Bacteriology*, [s. l.], v. 190, n. 10, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01850-07>.

GARRIGA, X. et al. Characterization to species level of clinical isolates of the *Mycobacterium avium* complex by DNA probes, DT1–DT6 PCR and PCR–restriction enzyme analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, [s. l.], v. 5, n. 6, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1999.tb00159.x>

GLODIĆ, G. et al. Clinical relevance of differentiation between *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in *M. avium* complex pulmonary disease in Croatia. *Tuberculosis*, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.PA3002>

GOCHI, M. et al. Retrospective study of the predictors of mortality and radiographic deterioration in 782 patients with nodular/bronchiectatic *Mycobacterium avium* complex lung disease. *BMJ Open*, [s. l.], v. 5, n. 8, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008058>

GOLDSTEIN, B. P. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics*, [s. l.], v. 67, n. 9, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1038/ja.2014.107>

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, [s. l.], v. 27, n. 18, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027>

GONZÁLEZ-PÉREZ, M. et al. Virulence and Immune Response Induced by *Mycobacterium avium* Complex Strains in a Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis and Subcutaneous Infection in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*, [s. l.], v. 81, n. 11, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00150-13>

GOPALASWAMY, R. et al. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Biomedical Science*, [s. l.], v. 27, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00667-6>

GORIS, J. *et al.* DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, [s. l.], v. 57, n. 1, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>

GOUDE, R. et al. The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 53, n. 10, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00162-09>

GRIFFITH, D. E. et al. Amikacin Liposome Inhalation Suspension for Treatment-Refractory Lung Disease Caused by *Mycobacterium avium* Complex (CONVERT). A Prospective, Open-Label, Randomized Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 198, n. 12, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1318OC>

GRIFFITH, D. E. et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 175, n. 4, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>

GRIFFITH, D. E. et al. Clinical and Molecular Analysis of Macrolide Resistance in *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 174, n. 8, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.200603-450OC>

GRIFFITH, D. E. et al. Ethambutol Ocular Toxicity in Treatment Regimens for *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 172, n. 2, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.200407-863OC>

GRIFFITH, D. E. et al. The Significance of *Mycobacterium abscessus* Subspecies *abscessus* Isolation During *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease Therapy. *Chest*, [s. l.], v. 147, n. 5, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.14-1297>

GRIFFITH, D. E. Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex: “I Feel Like I’ve Been Here Before”. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 13, n. 11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201609-666ED>

GRIFFITH, D. Treatment of *Mycobacterium avium* Complex (MAC). *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 39, n. 03, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1660472>

GRÖBLACHER, B. et al. Putative Mycobacterial Efflux Inhibitors from the Seeds of *Aframomum melegueta*. *Journal of Natural Products*, [s. l.], v. 75, n. 7, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1021/np300375t>

GROTTOLA, A. et al. Pulmonary Disease Caused by *Mycobacterium marseillense*, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 20, n. 10, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2010.140309>

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>

GUPTA, S. et al. Efflux Inhibition with Verapamil Potentiates Bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 58, n. 1, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01462-13>

GUPTA, S. Selective IgM Deficiency with T Cell Defects and *Mycobacterium Avium* Complex (MAC) Infection. *The Open Immunology Journal*, [s. l.], v. 5, n. 1, 2012. Available at: <https://doi.org/10.2174/1874226201205010008>

HALICKI, P. C. B. et al. 2,2,2-trifluoro-1-(1,4,5,6-tetrahydropyridin-3-yl)ethanone derivative as efflux pump inhibitor in *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, [s. l.], v. 42, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128088>

HAN, X. Y. et al. Clinical Significance and Epidemiologic Analyses of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* among Patients without AIDS. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 43, n. 9, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4407-4412.2005>

HAN, Y. et al. Innate and Adaptive Immune Responses Against Microsporidia Infection in Mammals. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 11, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01468>

HARTMANN OCP et al. Phagocytosis and killing of *Mycobacterium avium* complex by human neutrophils. *J Leukoc Biol*, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 397–404, 2001.

HASSE, B. et al. International Society of Cardiovascular Infectious Diseases Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Disseminated *Mycobacterium chimaera* Infection Following Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *Journal of Hospital Infection*, [s. l.], v. 104, n. 2, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.10.009>

HAUG, M. et al. Dynamics of immune effector mechanisms during infection with *Mycobacterium avium* in C57BL/6 mice. *Immunology*, [s. l.], v. 140, n. 2, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/imm.12131>

HAWORTH, C. S. et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*, [s. l.], v. 72, n. Suppl 2, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210927>

HAYASHI, M. et al. Prognostic Factors of 634 HIV-Negative Patients with *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 185, n. 5, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201107-1203OC>

HOEFSLOOT, W. et al. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in COPD patients with exacerbations. *Journal of Infection*, [s. l.], v. 66, n. 6, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.12.011>

HENKLE, E.; WINTHROP, K. L. Nontuberculous Mycobacteria Infections in Immunosuppressed Hosts. *Clinics in Chest Medicine*, [s. l.], v. 36, n. 1, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.11.002>

HEIFETS L B. et al. Pyrazinamide is not active in vitro against *Mycobacterium avium* complex. *Am Rev Respir Dis*, [s. l.], v. 12, n. 134, p. 1287–1298, 1986.

HONDA, J. R.; KNIGHT, V.; CHAN, E. D. Pathogenesis and Risk Factors for Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Clinics in Chest Medicine*, [s. l.], v. 36, n. 1, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.001H>

HONDA, J. R.; VIRDI, R.; CHAN, E. D. Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02029>

HSIAO, C.-H. et al. Identification of nontuberculous mycobacterial infection by IS6110 and hsp65 gene analysis on lung tissues. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, [s. l.], v. 68, n. 3, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.017>

HUH, H. J. et al. GenoType NTM-DR Performance Evaluation for Identification of Mycobacterium avium Complex and Mycobacterium abscessus and Determination of Clarithromycin and Amikacin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 57, n. 8, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00516-19>

IKUYAMA, Y. et al. Comparison of clinical characteristics of patients with Mycobacterium avium complex disease by gender. *Epidemiology and Infection*, [s. l.], v. 147, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0950268819000293>

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. *Phytochemistry*, [s. l.], v. 61, n. 7, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)

INGÓLFSDÓTTIR, K., et al. (1998). Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 141–144. doi:10.1016/s0928-0987(97)00078-x

ITO, M. et al. Effective treatment with macrolide and ethambutol for mycobacterium avium complex pulmonary disease. *AME Medical Journal*, [s. l.], v. 5, 2020. Available at: <https://doi.org/10.21037/amj-20-66>

JADAUN, G. P. S. et al. Determination of ethambutol MICs for Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium isolates by resazurin microtitre assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s. l.], v. 60, n. 1, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm117>

JAMAL, M. A. et al. Molecular basis of clarithromycin-resistance in Mycobacterium avium–intracellulare complex. *Tubercle and Lung Disease*, [s. l.], v. 80, n. 1, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0227>

JEYANATHAN, M. et al. Evaluation of In Situ Methods Used To Detect Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Samples from Patients with Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 44, n. 8, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00585-06>

JOAO, I. et al. Identification of nontuberculous mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. *International Journal of Mycobacteriology*, [s. l.], v. 3, n. 2, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.04.001>

JOHANSEN, T. B. et al. Distribution of IS 1311 and IS 1245 in *Mycobacterium avium* Subspecies Revisited. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 43, n. 5, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2500-2502.2005>

JOHNSON MM; ODELL JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis*, [s. l.], v. 3, p. 210–220, 2014.

JOST, K. C. et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 33, n. 5, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.5.1270-1277.1995>

JUNGBLUT SCHUH, S. et al. Pulmonary disease and the autonomic nervous system: a new pathophysiological mechanism for Lady Windermere syndrome. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20200529>

KAMII, Y. et al. Adverse reactions associated with long-term drug administration in *Mycobacterium avium* complex lung disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, [s. l.], v. 22, n. 12, 2018. Available at: <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0171>

Kadota, T., Matsui, H., Hirose, T. et al. Analysis of drug treatment outcome in clarithromycin-resistant *Mycobacterium avium* complex lung disease. *BMC Infect Dis* 16, 31 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1384-7>

KANG, B. J. et al. Causes and Predictive Factors Associated with “Diagnosis Changed” Outcomes in Patients Notified as Tuberculosis Cases in a Private Tertiary Hospital. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, [s. l.], v. 75, n. 6, 2013. Available at: <https://doi.org/10.4046/trd.2013.75.6.238>

KHAM-NGAM, I. et al. Epidemiology of and risk factors for extrapulmonary nontuberculous mycobacterial infections in Northeast Thailand. *PeerJ*, [s. l.], v. 6, 2018. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.5479>

KIKUCHI, T. et al. *Mycobacterium avium* genotype is associated with the therapeutic response to lung infection. *Clinical Microbiology and Infection*, [s. l.], v. 20, n. 3, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12285>

KIM, B.-J. et al. *Mycobacterium yongonense* sp. nov., a slow-growing non-chromogenic species closely related to *Mycobacterium intracellulare*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 63, n. Pt_1, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.037465-0>

KIM, H.-J. et al. Role of ethambutol and rifampicin in the treatment of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine*, [s. l.], v. 19, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0982-8>

KIM, S. H.; SHIN, J. H. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, [s. l.], v. 32, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcla.22184>

KIM, S.-Y. et al. Association between 16S rRNA gene mutations and susceptibility to amikacin in *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* clinical isolates. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85721-5>

KIM, S.-Y. et al. First case of nontuberculous mycobacterial lung disease caused by *Mycobacterium marseillense* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, [s. l.], v. 79, n. 3, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.019>

KIMIZUKA, Y. et al. Retrospective evaluation of natural course in mild cases of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *PLOS ONE*, [s. l.], v. 14, n. 4, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216034>

KITADA, S. et al. Serodiagnosis of Mycobacterium avium complex pulmonary disease in the USA. *European Respiratory Journal*, [s. l.], v. 42, n. 2, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1183/09031936.00098212>

KITADA, S. et al. Use of Glycopeptidolipid Core Antigen for Serodiagnosis of Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease in Immunocompetent Patients. *Clinical and Vaccine Immunology*, [s. l.], v. 12, n. 1, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.44-51.2005>

KITAURA, H. et al. Fibronectin-binding proteins secreted by Mycobacterium avium Note. *APMIS*, [s. l.], v. 108, n. 9, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2000.d01-97.x>

KOH, W.-J. et al. Clinical Significance of the Differentiation Between Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare in M avium Complex Lung Disease. *Chest*, [s. l.], v. 142, n. 6, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.12-0494>

KOH, W.-J. et al. Increasing Recovery of Nontuberculous Mycobacteria from Respiratory Specimens over a 10-Year Period in a Tertiary Referral Hospital in South Korea. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, [s. l.], v. 75, n. 5, 2013. Available at: <https://doi.org/10.4046/trd.2013.75.5.199>

KOHNO, Y. et al. In Vitro and In Vivo Activities of Novel Fluoroquinolones Alone and in Combination with Clarithromycin against Clinically Isolated Mycobacterium avium Complex Strains in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 51, n. 11, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00410-07>

KOMIJJN, R. E. et al. Prevalence of Mycobacterium avium in Slaughter Pigs in The Netherlands and Comparison of IS 1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of Porcine and Human Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 37, n. 5, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.5.1254-1259.1999>

KONTTURI, A. et al. Increase in Childhood Nontuberculous Mycobacterial Infections After Bacille Calmette-Guérin Coverage Drop: A Nationwide, Population-Based

Retrospective Study, Finland, 1995–2016. *Clinical Infectious Diseases*, [s. l.], v. 67, n. 8, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy241>

KRISTIANSEN J. et al. Phenothiazines as a solution for multidrug resistant tuberculosis: From the origin to present. *Int Microbiol*, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–12, 2015.

KOURTESI, C. et al. Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. *The Open Microbiology Journal*, [s. l.], v. 7, n. 1, 2013. Available at: <https://doi.org/10.2174/1874285801307010034>

KUMFER, A. M.; EDRISS, H. Lady Windermere syndrome. *The Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles*, [s. l.], v. 5, n. 20, 2017. Available at: <https://doi.org/10.12746/swrccc.v5i20.402>

KWON, B. S. et al. In Vitro MIC Values of Rifampin and Ethambutol and Treatment Outcome in Mycobacterium avium Complex Lung Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 62, n. 10, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00491-18>

KWON, B. S. et al. The natural history of non-cavitary nodular bronchiectatic Mycobacterium avium complex lung disease. *Respiratory Medicine*, [s. l.], v. 150, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.02.007>

KWON, Y. S. et al. Treatment Outcomes after Discontinuation of Ethambutol due to Adverse Events in Mycobacterium avium Complex Lung Disease. *Journal of Korean Medical Science*, [s. l.], v. 35, n. 9, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e59>

LAHIRI, A. et al. Abundance of Mycobacterium avium ssp. hominissuis in soil and dust in Germany - implications for the infection route. *Letters in Applied Microbiology*, [s. l.], v. 59, n. 1, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1111/lam.12243>

LANDE, L. et al. Mycobacterium avium in Community and Household Water, Suburban Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2010 – 2012. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 25, n. 3, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2503.180336>

LANDE, L.; GEORGE, J.; PLUSH, T. Mycobacterium avium complex pulmonary disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, [s. l.], v. 31, n. 2, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000437>

LEE, A. S. et al. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Medical Microbiology*, [s. l.], v. 58, n. 7, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.007484-0>

LEE, A. S. G. et al. Novel Mutations within the embB Gene in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 48, n. 11, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4447-4449.2004>

LEE, G. et al. Nodular Bronchiectatic Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease. Natural Course on Serial Computed Tomographic Scans. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 10, n. 4, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201303-062OC>

LEE, H. et al. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Infection, South Korea, 2007–2016. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 25, n. 3, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2503.181597>

LEE, S. K. et al. Changing epidemiology of nontuberculous mycobacterial lung disease in South Korea. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 44, n. 10, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.681695>

LEE, S.-Y. et al. Mycobacterium paraintracellulare sp. nov., for the genotype INT-1 of Mycobacterium intracellulare. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 66, n. 8, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001158>

Lee N, Nguyen H. Ethambutol. 2020 Jun 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 32644476.

LI, X.-Z.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs*, [s. l.], v. 69, n. 12, 2009. Available at: <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>

LI, X.-Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 28, n. 2, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>

LIAO, T.-L. et al. Risk Factors and Outcomes of Nontuberculous Mycobacterial Disease among Rheumatoid Arthritis Patients: A Case-Control study in a TB Endemic Area. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 6, n. 1, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep29443>

LIM, A. Y. H. et al. Profiling non-tuberculous mycobacteria in an Asian setting: characteristics and clinical outcomes of hospitalized patients in Singapore. *BMC Pulmonary Medicine*, [s. l.], v. 18, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0637-1>

LIU, H. et al. Identification of Species of Nontuberculous Mycobacteria Clinical Isolates from 8 Provinces of China. *BioMed Research International*, [s. l.], v. 2016, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/2153910>

LIU, P. T. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science*, [s. l.], v. 311, n. 5768, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1123933>

LOPEZ-LUIS, B. A. et al. Nontuberculous mycobacterial infection in a tertiary care center in Mexico, 2001–2017. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 24, n. 3, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.04.012>

LOEBINGER, M. R. *Mycobacterium avium* complex infection: phenotypes and outcomes. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 50, n. 3, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.01380-2017>

LU, M. et al. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, [s. l.], v. 29, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.05.001>

LUMB, R. et al. Investigation of Spa Pools Associated with Lung Disorders Caused by *Mycobacterium avium* Complex in Immunocompetent Adults. *Applied and*

Environmental Microbiology, [s. l.], v. 70, n. 8, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4906-4910.2004>

LUTHRA, S.; ROMINSKI, A.; SANDER, P. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium abscessus Drug Resistance. Frontiers in Microbiology, [s. l.], v. 9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02179>

MACHADO, D. et al. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. PLoS ONE, [s. l.], v. 7, n. 4, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034538>

MACHADO, D. et al. Boosting Effect of 2-Phenylquinoline Efflux Inhibitors in Combination with Macrolides against Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium avium. ACS Infectious Diseases, [s. l.], v. 1, n. 12, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00052>

MAIGA, M. et al. Failure to Recognize Nontuberculous Mycobacteria Leads to Misdiagnosis of Chronic Pulmonary Tuberculosis. PLoS ONE, [s. l.], v. 7, n. 5, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036902>

MALEKI, M. R. et al. Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from hospital water by sequence analysis of the hsp65 and 16S rRNA genes. Journal of Water and Health, [s. l.], v. 15, n. 5, 2017. Available at: <https://doi.org/10.2166/wh.2017.046>

MANTILLA, B. et al. LADY WINDERMERE IN DISGUISE. Chest, [s. l.], v. 158, n. 4, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.08.424>

MARRAS, T. K. et al. Opinions Differ by Expertise in Mycobacterium avium Complex Disease. Annals of the American Thoracic Society, [s. l.], v. 11, n. 1, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201305-136OC>

MARRAS, T. K. et al. Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Ontario, Canada, 1998–2010. Emerging Infectious Diseases, [s. l.], v. 19, n. 11, 2013. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1911.130737>

MARTIN, A. *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 47, n. 11, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3616-3619.2003>

MARTINS, A. B.; MATOS, E. D.; LEMOS, A. C. M. Infection with the *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions: a case report and literature review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 9, n. 2, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702005000200009>

MASLOW, J. N. *et al.* Hemolysin as a Virulence Factor for Systemic Infection with Isolates of *Mycobacterium avium* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 37, n. 2, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.2.445-446.1999>

MATSUNAGA, I. *et al.* Identification of antibody responses to the serotype-nonspecific molecular species of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s. l.], v. 377, n. 1, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.091>

MAURER, F. P. *et al.* Aminoglycoside-modifying enzymes determine the innate susceptibility to aminoglycoside antibiotics in rapidly growing mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s. l.], v. 70, n. 5, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dku550>

MCGUFFIN, S. A.; POTTINGER, P. S.; HARNISCH, J. P. Clofazimine in Nontuberculous Mycobacterial Infections: A Growing Niche. *Open Forum Infectious Diseases*, [s. l.], v. 4, n. 3, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx147>

MDLULI, K. *et al.* Mechanisms involved in the intrinsic isoniazid resistance of *Mycobacterium avium*. *Molecular Microbiology*, [s. l.], v. 27, n. 6, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00774.x>

MEDIAVILLA-GRADOLPH, M. C. *et al.* Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. *BioMed Research International*, [s. l.], v. 2015, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/854078>

MEIER, A. et al. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 38, n. 2, 1994. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.38.2.381>

MENICHINI, M.; LARI, N.; RINDI, L. Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of *Mycobacterium avium* complex to clarithromycin. *The Journal of Antibiotics*, [s. l.], v. 73, n. 2, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0245-1>

MIDDLETON, A. M. et al. Inhibition of adherence of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* to fibronectin on the respiratory mucosa. *Respiratory Medicine*, [s. l.], v. 98, n. 12, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2004.04.013>

MIJS, W. et al. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and “*M. avium* subsp. *hominissuis*” for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 52, n. 5, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1505>

MIYATA, M. *et al.* Comparison of resazurin microtiter assay performance and BACTEC MGIT 960 in the susceptibility testing of Brazilian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line drugs. ***Brazilian Journal of Microbiology***, [s. l.], v. 44, n. 1, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000028>

MIRSAEIDI, M. et al. Nontuberculous Mycobacterial Disease Mortality in the United States, 1999–2010: A Population-Based Comparative Study. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 9, n. 3, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091879>

MIRSAEIDI, M.; SADIKOT, R. T. Gender susceptibility to mycobacterial infections in patients with non-CF bronchiectasis. *International Journal of Mycobacteriology*, [s. l.], v. 4, n. 2, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.05.002>

MIRZAPOUR, A. et al. Identification of nontuberculous mycobacteria by high-performance liquid chromatography from patients in tehran. *International Journal of*

Mycobacteriology, [s. l.], v. 5, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.09.003>

MITCHISON, D. A. Prevention of Drug Resistance by Combined Drug Treatment of Tuberculosis. [s. l.], 2012. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4_6

MNYAMBWA, N. P. et al. Genome sequence of *Mycobacterium yongonense* RT 955-2015 isolate from a patient misdiagnosed with multidrug-resistant tuberculosis: First clinical detection in Tanzania. *International Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 71, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.796>

MODRÁ et al. Socio-Economic and Environmental Factors Related to Spatial Differences in Human Non-Tuberculous Mycobacterial Diseases in the Czech Republic. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, [s. l.], v. 16, n. 20, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph16203969>

MOK, S.; ROGERS, T. R.; FITZGIBBON, M. Evaluation of GenoType NTM-DR Assay for Identification of *Mycobacterium chimaera*. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 55, n. 6, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00009-17>

MOON, S. M. et al. Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Resistance Mutations Associated with Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 60, n. 11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01240-16>

MORIMOTO, K. et al. Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease: Analysis of 102 Consecutive Cases. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 13, n. 11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201604-246OC>

MORSCZECK, C.; BERGER, S.; PLUM, G. The macrophage-induced gene (mig) of *Mycobacterium avium* encodes a medium-chain acyl-coenzyme A synthetase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, [s. l.], v. 1521, n. 1–3, 2001. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00287-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00287-1)

MOTAMEDI, N.; DANELISHVILI, L.; BERMUDEZ, L. E. Identification of *Mycobacterium avium* genes associated with resistance to host antimicrobial peptides.

Journal of Medical Microbiology, [s. l.], v. 63, n. 7, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.072744-0>

MOURE, R. et al. Characterization of the embB gene in Mycobacterium tuberculosis isolates from Barcelona and rapid detection of main mutations related to ethambutol resistance using a low-density DNA array--authors' response. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, [s. l.], v. 69, n. 8, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dku134>

MUKHERJEE, R.; CHATTERJI, D. Glycopeptidolipids: Immuno-modulators in greasy mycobacterial cell envelope. IUBMB Life, [s. l.], v. 64, n. 3, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1002/iub.602>

MULLIS, S. N.; FALKINHAM, J. O. Adherence and biofilm formation of Mycobacterium avium , Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium abscessus to household plumbing materials. Journal of Applied Microbiology, [s. l.], v. 115, n. 3, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/jam.12272>

MURCIA, M. I. et al. Mycobacterium colombiense sp. nov., a novel member of the Mycobacterium avium complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, [s. l.], v. 56, n. 9, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64190-0>

NAMKOONG, H. et al. Refractory tenosynovitis with 'rice bodies' in the hand due to Mycobacterium intracellulare. Infection, [s. l.], v. 44, n. 3, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0844-0>

NASIRI, M. J. et al. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. Frontiers in Microbiology, [s. l.], v. 8, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00681>

NEUSCHLOVA, M. et al. Identification of Mycobacterium Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry. [s. l.], 2017. Available at: https://doi.org/10.1007/5584_2017_26

NISHIMURA, T. et al. Middle-aged to elderly women have a higher asymptomatic infection rate with *Mycobacterium avium* complex, regardless of body habitus. *Respirology*, [s. l.], v. 21, n. 3, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1111/resp.12699>

NISHIMURA, T. et al. Recurrence of Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Disease in a Patient with Anti-Gamma Interferon Autoantibodies by Reinfection. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 53, n. 4, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.03339-14>

NISHIMURA, T. et al. Serodiagnostic Contributions of Antibody Titers against Mycobacterial Lipid Antigens in *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Clinical Infectious Diseases*, [s. l.], v. 49, n. 4, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1086/600888>

NISHIUCHI, Y.; IWAMOTO, T.; MARUYAMA, F. Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Frontiers in Medicine*, [s. l.], v. 4, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00027>

NISHIUCHI, Y.; IWAMOTO, T.; MARUYAMA, F. Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Frontiers in Medicine*, [s. l.], v. 4, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00027>

NORTON, C. D.; LECHEVALLIER, M. W.; FALKINHAM, J. O. Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water Research*, [s. l.], v. 38, n. 6, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.07.008>

NOVOSAD, S.; HENKLE, E.; WINTHROP, K. L. The challenge of pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *Current Pulmonology Reports*, [s. l.], v. 4, n. 3, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13665-015-0119-3>

O'BRIEN, C. R. et al. Feline leprosy due to *Mycobacterium lepraemurium* : Further clinical and molecular characterisation of 23 previously reported cases and an additional 42 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, [s. l.], v. 19, n. 7, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1177/1098612X17706469>

OBATA, S. et al. Association of rpoB mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium avium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, [s. l.], v. 27, n. 1, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.015>

OLIVEIRA, R. S. et al. Identification of *Mycobacterium avium* Genotypes with Distinctive Traits by Combination of IS 1245 -Based Restriction Fragment Length Polymorphism and Restriction Analysis of hsp65. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 41, n. 1, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.44-49.2003>

OLIVIER, K. N. et al. Nontuberculous *Mycobacteria*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 167, n. 6, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-678>

OKADA N. et al. Low Leptin Level Might Increase Susceptibility to *Mycobacterium Avium* Complex Infection. *J Respir Med Lung Dis*, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 1006–1010, 2016.

ORME, I. et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. Tuberculosis drug screening program. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 7, p. 1943-6, 2001. doi: 10.1128/AAC.45.7.1943-1946.2001

PALOMINO, J.-C. *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 8, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>

PAMPALONI, A. et al. Skin and soft tissue infection by *Mycobacterium intracellulare* in an immunocompetent patient. *IDCases*, [s. l.], v. 19, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00720>

PAN, S.-W. et al. Treatment for *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, [s. l.], v. 119, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.05.006>

PANUNTO, A. C.; VILLARES, M. C. B.; RAMOS, M. C. IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* from patients admitted to a reference

hospital in Campinas, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, [s. l.], v. 36, n. 10, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003001000017>

PARK, H.-E. et al. 16S and 23S rRNA Gene Mutation Independent Multidrug Resistance of Non-Tuberculous Mycobacteria Isolated from South Korean Soil. *Microorganisms*, [s. l.], v. 8, n. 8, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081114>

PARK, S. C. et al. Prevalence, incidence, and mortality of nontuberculous mycobacterial infection in Korea: a nationwide population-based study. *BMC Pulmonary Medicine*, [s. l.], v. 19, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0901-z>

PARK, T. Y. et al. Natural course of the nodular bronchiectatic form of Mycobacterium Avium complex lung disease: Long-term radiologic change without treatment. *PLOS ONE*, [s. l.], v. 12, n. 10, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185774>

PARK, Y. et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with macrolide-resistant Mycobacterium avium complex pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respiratory Research*, [s. l.], v. 20, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1258-9>

PARKER, H. et al. Mechanisms of Antibiotic Tolerance in Mycobacterium avium Complex: Lessons From Related Mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 11, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573983>

PEDRO, H. da S. P. et al. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, [s. l.], v. 34, n. 11, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132008001100010>

PENNINGTON, K. M. et al. Approach to the diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial disease. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, [s. l.], v. 24, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2021.100244>

PEREIRA, A. C. et al. Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of Virulence and Adaptation to Ecological Niches. *Microorganisms*, [s. l.], v. 8, n. 9, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091380>

PETERSEN, E. A. et al. Liposomal amikacin: improved treatment of *Mycobacterium avium* complex infection in the beige mouse model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s. l.], v. 38, n. 5, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/38.5.819>

PFEFFER, P. E. et al. An association between pulmonary *Mycobacterium avium*-intracellulare complex infections and biomarkers of Th2-type inflammation. *Respiratory Research*, [s. l.], v. 18, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0579-9>

PFISTER, P. et al. The Structural Basis of Macrolide–Ribosome Binding Assessed Using Mutagenesis of 23S rRNA Positions 2058 and 2059. *Journal of Molecular Biology*, [s. l.], v. 342, n. 5, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.095>

PHILIPPEAU, M. et al. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in French Polynesia. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 53, n. 12, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01560-15>

PHILALAY, J. S. et al. Genes Required for Intrinsic Multidrug Resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 48, n. 9, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3412-3418.2004>

PHILLEY, J. V. et al. Preliminary Results of Bedaquiline as Salvage Therapy for Patients With Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Chest*, [s. l.], v. 148, n. 2, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.14-2764>

PIDDOCK, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 19, n. 2, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Extrapulmonary Infections Associated with Nontuberculous Mycobacteria in Immunocompetent Persons. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 15, n. 9, 2009. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1509.081259>

PLUM, G. et al. Cloning, sequencing, and expression of the mig gene of *Mycobacterium avium*, which codes for a secreted macrophage-induced protein. *Infection and Immunity*, [s. l.], v. 65, n. 11, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.65.11.4548-4557.1997>

PRACHAYASITTIKUL S et al. New bioactive triterpenoids and antimalarial activity of *Diospyros rubra*. *EXCLI J.*, [s. l.], v. 9, p. 1--1-, 2010.

PRIMM, T. P.; LUCERO, C. A.; FALKINHAM, J. O. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 17, n. 1, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.98-106.2004>

PULE, C. M. et al. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [s. l.], v. 71, n. 1, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv316>

QASEM, A.; NASER, S. A. TNF α inhibitors exacerbate *Mycobacterium paratuberculosis* infection in tissue culture: a rationale for poor response of patients with Crohn's disease to current approved therapy. *BMJ Open Gastroenterology*, [s. l.], v. 5, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2018-000216>

QUAN, T. P. *et al.* Evaluation of Whole-Genome Sequencing for Mycobacterial Species Identification and Drug Susceptibility Testing in a Clinical Setting: a Large-Scale Prospective Assessment of Performance against Line Probe Assays and Phenotyping. ***Journal of Clinical Microbiology***, [s. l.], v. 56, n. 2, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01480-17>

RAHMAN, S. A. et al. Comparative Analyses of Nonpathogenic, Opportunistic, and Totally Pathogenic Mycobacteria Reveal Genomic and Biochemical Variabilities and Highlight the Survival Attributes of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*, [s. l.], v. 5, n. 6, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.02020-14>

RAMAZANZADEH, R.; MOHAMMADI, B.; MOHAJERI, P. Mutations in embB gene associated with resistance to ethambutol in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from TB patients in the west of Iran (2014–15). *International Journal of Mycobacteriology*, [s. l.], v. 5, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.11.013>

RAMIS, I. B. et al. Antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria using the rapid colorimetric method. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, [s. l.], v. 34, n. 7, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2365-2>

RAMIS, I. et al. Antimicrobial and Efflux Inhibitor Activity of Usnic Acid Against Mycobacterium abscessus. *Planta Medica*, [s. l.], v. 84, n. 17, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1055/a-0639-5412>

RAMOS, D. F.; ALMEIDA DA SILVA, P. E. Antimycobacterial activity of usnic acid against resistant and susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria. *Pharmaceutical Biology*, [s. l.], v. 48, n. 3, 2010. Available at: <https://doi.org/10.3109/13880200903085490>

RASTOGI, N.; BACHELET, M.; SOUSA, J. P. C. Intracellular growth of Mycobacterium avium in human macrophages is linked to the increased synthesis of prostaglandin E 2 and inhibition of the phagosome-lysosome fusions. *FEMS Microbiology Letters*, [s. l.], v. 89, n. 5, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05006.x>

RATNATUNGA, C. N. et al. The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 11, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00303>

REICH, J. M.; JOHNSON, R. E. Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease Presenting as an Isolated Lingular or Middle Lobe Pattern. *Chest*, [s. l.], v. 101, n. 6, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1605>

REICH, J. M.; JOHNSON, R. E. Mycobacterium avium Complex Lung Disease in Women. *Chest*, [s. l.], v. 107, n. 1, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.107.1.293-a>

RENVOISE, A. et al. Significant Difference in Drug Susceptibility Distribution between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 52, n. 12, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02127-14>

RICCARDI, N. et al. *Mycobacterium chimaera* infections: An update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, [s. l.], v. 26, n. 3, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.11.004>

RINDI, L. Efflux Pump Inhibitors against Nontuberculous *Mycobacteria*. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 21, n. 12, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21124191>

RINGSHAUSEN, F. C. et al. Prevalence of Nontuberculous *Mycobacterial* Pulmonary Disease, Germany, 2009–2014. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 22, n. 6, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2206.151642>

RITACCO, V. et al. IS 1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacterium avium* Isolates: Proposal for Standardization. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 36, n. 10, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.36.10.3051-3054.1998>

ROCHA, D.; FELGUEIRAS, Ó.; DUARTE, R. Can environmental determinants explain Nontuberculous *Mycobacteria* geographic incidence? *Pulmonology*, [s. l.], v. 26, n. 3, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2019.12.003>

LUCARINI R. Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, [s. l.], v. 11, n. 20, 2012. Available at: <https://doi.org/10.5897/AJB11.3551>

RODRIGUES, L. et al. Inhibition of Drug Efflux in *Mycobacteria* with Phenothiazines and Other Putative Efflux Inhibitors. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, [s. l.], v. 6, n. 2, 2011. Available at: <https://doi.org/10.2174/157489111796064579>

RODRIGUES, L. et al. The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents*, [s. l.], v. 34, n. 6, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.07.010>

RODRIGUES, L.; CRAVO, P.; VIVEIROS, M. Efflux pump inhibitors as a promising adjunct therapy against drug resistant tuberculosis: a new strategy to revisit mycobacterial targets and repurpose old drugs. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, [s. l.], v. 18, n. 8, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1760845>

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. et al. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 54, n. 4, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02760-15>

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 53, n. 8, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01380-15>

ROJAS-ESPINOSA, O.; LOVIK, M. *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* infections in domestic and wild animals. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, [s. l.], v. 20, n. 1, 2001. Available at: <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1271>

ROSSI, E. De; AÍNSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 30, n. 1, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00002.x>

RUBINO, C. M. et al. Population Pharmacokinetic Evaluation of Amikacin Liposome Inhalation Suspension in Patients with Treatment-Refractory Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, [s. l.], v. 46, n. 2, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13318-020-00669-7>

ROTH, A et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of clinical microbiology* vol. 36,1 (1998): 139-47. doi:10.1128/JCM.36.1.139-147.1998

RUF, B.; SCHÜRMAN, D.; MAUCH, H. Acquired Resistance of *M. tuberculosis* to Clarithromycin. *American Review of Respiratory Disease*, [s. l.], v. 145, n. 5, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1164/ajrccm/145.5.1241b>

RUNYON, E. H. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Medical Clinics of North America*, [s. l.], v. 43, n. 1, 1959. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34193-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34193-1)

RUSSELL, C. D. et al. Non-tuberculous mycobacteria: a retrospective review of Scottish isolates from 2000 to 2010: Table 1. *Thorax*, [s. l.], v. 69, n. 6, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-204260>

RUTH, M. M. et al. Thioridazine Is an Efflux Pump Inhibitor in *Mycobacterium avium* Complex but of Limited Clinical Relevance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 64, n. 7, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00181-20>

SAIFI, M. et al. HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, [s. l.], v. 19, n. 8, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04005.x>

SAITO, H. et al. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 28, n. 8, 1990. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.28.8.1694-1697.1990>

SATO K, A. et al. Invasion and intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex adapted to intramacrophagic environment within macrophages and type II alveolar epithelial cells. *Kekkaku*, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 53–57, 2001.

SATO, K. et al. Type II Alveolar Cells Play Roles in Macrophage-Mediated Host Innate Resistance to Pulmonary Mycobacterial Infections by Producing Proinflammatory Cytokines. *The Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 185, n. 8, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1086/340040>

SATTA, G. R. F. C. R. Mycobacterium Avium Complex: Cutaneous Infection in an Immunocompetent Host. *Acta Dermato-Venereologica*, [s. l.], v. 79, n. 3, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1080/000155599750011200>

SAXENA, S.; SPAINK, H. P.; FORN-CUNÍ, G. Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models. *Biology*, [s. l.], v. 10, n. 2, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology10020096>

SCHMALSTIEG, A. M. et al. The Antibiotic Resistance Arrow of Time: Efflux Pump Induction Is a General First Step in the Evolution of Mycobacterial Drug Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 56, n. 9, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.05546-11>

SCHOREY, J. S.; SWEET, L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*, [s. l.], v. 18, n. 11, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn076LO>

SEBASTIAN, G. et al. "Identification of Non-Tuberculous Mycobacterium by LPA (CM/AS) assay, HPLC and biochemical test: which is feasible for RNTCP?" *Indian Journal of Tuberculosis*, [s. l.], v. 65, n. 4, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2018.08.003>

SECOTT, T. E.; LIN, T. L.; WU, C. C. Fibronectin Attachment Protein Homologue Mediates Fibronectin Binding by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Infection and Immunity*, [s. l.], v. 69, n. 4, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2075-2082.2001S>

SEXTON, P.; HARRISON, A. C. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. *European Respiratory Journal*, [s. l.], v. 31, n. 6, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1183/09031936.00140007>

SHAH, J. A. et al. Nontuberculous Mycobacteria and Heterologous Immunity to Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 220, n. 7, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz285>

SHAH, N. M. et al. Pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* is the main driver of the rise in non-tuberculous mycobacteria incidence in England, Wales and Northern Ireland, 2007–2012. *BMC Infectious Diseases*, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1521-3>

SHIMOMURA, H. et al. Serum concentrations of clarithromycin and rifampicin in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease: long-term changes due to drug interactions and their association with clinical outcomes. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, [s. l.], v. 1, n. 1, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40780-015-0029-0>

SHIN, J.-I.; SHIN, S. J.; SHIN, M.-K. Differential Genotyping of *Mycobacterium avium* Complex and Its Implications in Clinical and Environmental Epidemiology. *Microorganisms*, [s. l.], v. 8, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010098>

SHIN, S. J. et al. Efficient Differentiation of *Mycobacterium avium* Complex Species and Subspecies by Use of Five-Target Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 48, n. 11, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00904-10>

SHIRAIISHI, Y. et al. Surgery for *Mycobacterium avium* complex lung disease in the clarithromycin era. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, [s. l.], v. 21, n. 2, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(01\)01122-8](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(01)01122-8)

SHU, C.-C. et al. Attenuation of lymphocyte immune responses during *Mycobacterium avium* complex-induced lung disease due to increasing expression of programmed death-1 on lymphocytes. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep42004>

SHULHA, J. A.; ESCALANTE, P.; WILSON, J. W. Pharmacotherapy Approaches in Nontuberculous Mycobacteria Infections. *Mayo Clinic Proceedings*, [s. l.], v. 94, n. 8, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.12.011>

SHUTO, H. et al. Efficacy and safety of fluoroquinolone-containing regimens in treating pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease: A propensity score analysis.

PLOS ONE, [s. l.], v. 15, n. 7, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235797>

SIENIAWSKA, E. et al. Usnic Acid Treatment Changes the Composition of Mycobacterium tuberculosis Cell Envelope and Alters Bacterial Redox Status. *mSystems*, [s. l.], 2021. Available at: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00097-21>

SILVA, L. et al. In vitro and in silico analysis of the efficiency of tetrahydropyridines as drug efflux inhibitors in Escherichia coli. *International Journal of Antimicrobial Agents*, [s. l.], v. 49, n. 3, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.024>

SIMNER, P. J. et al. Mycobacterium : Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria. In: *MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch31>

SIMONS, S. et al. Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 17, n. 3, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1703.100604>

SINHA, S. et al. Usnic acid modifies <scp>MRSA</scp> drug resistance through down-regulation of proteins involved in peptidoglycan and fatty acid biosynthesis. *FEBS Open Bio*, [s. l.], v. 9, n. 12, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12650>

SIRCILI, M. P.; ROXO, E.; LEÃO, S. C. Discrimination of members of the Mycobacterium avium complex by polymerase chain reaction. *Revista de Microbiologia*, [s. l.], v. 30, n. 2, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000200011>

SKOLNIK, K.; KIRKPATRICK, G.; QUON, B. S. Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, [s. l.], v. 8, n. 4, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40506-016-0092-6>

SLUTSKY, A. M. et al. Polyclonal infections due to Mycobacterium avium complex in patients with AIDS detected by pulsed-field gel electrophoresis of sequential clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 32, n. 7, 1994. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.32.7.1773-1778.1994>

STOUT, J. E.; KOH, W.-J.; YEW, W. W. Update on pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *International Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 45, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.006>

TAYLOR, R. H. et al. Chlorine, Chloramine, Chlorine Dioxide, and Ozone Susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 66, n. 4, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1702-1705.2000>

TELENTI, A. et al. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine*, [s. l.], v. 3, n. 5, 1997. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm0597-567>

THIERRY, D. et al. Rapid Identification of *Mycobacterium avium* intracellulare Complex Strains: Clinical Practice Evaluation of DT6 and DT1 Probes. *Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 168, n. 5, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/168.5.1337>

THEGERSTRÖM, J. et al. *Mycobacterium avium* Lymphadenopathy among Children, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 14, n. 4, 2008. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1404.060570>

THOMSON, R. et al. Isolation of Nontuberculous Mycobacteria (NTM) from Household Water and Shower Aerosols in Patients with Pulmonary Disease Caused by NTM. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 51, n. 9, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00899-13>

THOMSON, R. M.; ARMSTRONG, J. G.; LOOKE, D. F. Gastroesophageal Reflux Disease, Acid Suppression, and *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Chest*, [s. l.], v. 131, n. 4, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.06-1906>

THOREL, M.-F.; KRICHEVSKY, M.; VINCENT LEVY-FREBAULT, V. Numerical Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Emended Description of *Mycobacterium avium*, and Description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *s.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, [s. l.], v. 40, n. 3, 1990. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-254>

TOBIN-D'ANGELO, M. J. et al. Hospital Water as a Source of Mycobacterium avium Complex Isolates in Respiratory Specimens. *The Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 189, n. 1, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1086/380492>

TOKA ÖZER, T. et al. Determination of antibiotic resistance and high-performance liquid chromatography profiles for Mycobacterium species. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, [s. l.], v. 32, n. 7, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcla.22459>

TOMIOKA, H. et al. Identification of Mycobacterium avium complex strains belonging to serovars 21–28 by three commercial DNA probe tests. *Tubercle and Lung Disease*, [s. l.], v. 74, n. 2, 1993. Available at: [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(93\)90033-](https://doi.org/10.1016/0962-8479(93)90033-)

TORTOLI, E. Epidemiology of cervico-facial pediatric lymphadenitis as a result of nontuberculous mycobacteria. *International Journal of Mycobacteriology*, [s. l.], v. 1, n. 4, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2012.10.008>

TORTOLI, E. et al. Commercial DNA Probes for Mycobacteria Incorrectly Identify a Number of Less Frequently Encountered Species. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 48, n. 1, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01536-09>

TORTOLI, E. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus Mycobacterium. *Clinical Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 27, n. 4, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>

TORTOLI, E. The Taxonomy of the Genus Mycobacterium. *Nontuberculous Mycobacteria (NTM)*, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814692-7.00001-2>

TOSUN, F. et al. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *Journal of Ethnopharmacology*, [s. l.], v. 95, n. 2–3, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.07.011>

TRAN, Q. T.; HAN, X. Y. Subspecies Identification and Significance of 257 Clinical Strains of Mycobacterium avium. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 52, n. 4, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.03399-13>

TSUKAMURA, M.; MIZUNO, S.; TSUKAMURA, S. Numerical Classification of Atypical Mycobacteria. *Japanese Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 11, n. 4, 1967. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1967.tb00341.x>

TSUYUGUCHI, K. et al. Effect of oestrogen on Mycobacterium avium complex pulmonary infection in mice. *Clinical & Experimental Immunology*, [s. l.], v. 123, n. 3, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01474.x>

TURENNE, C. Y. et al. Sequencing of hsp65 Distinguishes among Subsets of the Mycobacterium avium Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 44, n. 2, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.433-440.2006>

TZOU, C. L. et al. Association between Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease and Mycobacteria in Home Water and Soil. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 17, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201812-915>

UWAMINO, Y. et al. Correction to: Low serum estradiol levels are related to Mycobacterium avium complex lung disease: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, [s. l.], v. 20, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4868-4>

UCHIYA, K. *et al.* Comparative genome analyses of Mycobacterium avium reveal genomic features of its subspecies and strains that cause progression of pulmonary disease. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep39750>

VAN DER WERF, M. J. et al. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infectious Diseases*, [s. l.], v. 14, n. 1, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-62>

VAN INGEN, J. et al. A definition of the Mycobacterium avium complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 68, n. 11, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003026>

VAN INGEN, J. et al. Management of Drug Toxicity in Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease: An Expert Panel Survey. *Clinical Infectious Diseases*, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1361>

VAN INGEN, J. et al. Proposal to elevate Mycobacterium avium complex ITS sequevar MAC-Q to Mycobacterium vulneris sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, [s. l.], v. 59, n. 9, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008854-0>

VAN INGEN, J. Microbiological Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. *Clinics in Chest Medicine*, [s. l.], v. 36, n. 1, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.11.005>

VANDE WEYGAERDE, Y. et al. Clinical relevance of pulmonary non-tuberculous mycobacterial isolates in three reference centres in Belgium: a multicentre retrospective analysis. *BMC Infectious Diseases*, [s. l.], v. 19, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4683-y>

VENKATAPRASAD, N. et al. Induction of Prostaglandin E2 by Human Monocytes Infected with Mycobacterium avium Complex-Modulation of Cytokine Expression. *Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 174, n. 4, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/174.4.806>

VERDIER, J. et al. Specific IgG Response against Mycobacterium avium paratuberculosis in Children and Adults with Crohn's Disease. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 8, n. 5, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062780>

VESENBECKH, S. et al. Bedaquiline as a potential agent in the treatment of Mycobacterium abscessus infections. *European Respiratory Journal*, [s. l.], v. 49, n. 5, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.00083-2017>

VIALE, M. N. et al. Characterization of a Mycobacterium avium subsp. avium Operon Associated with Virulence and Drug Detoxification. *BioMed Research International*, [s. l.], v. 2014, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/809585>

VIANNA, J. S. et al. The Contribution of Efflux Pumps in Mycobacterium abscessus Complex Resistance to Clarithromycin. *Antibiotics*, [s. l.], v. 8, n. 3, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030153>

VINCENT, A. T. et al. The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution? *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02341>

VIVEIROS, M. et al. Evaluation of Efflux Activity of Bacteria by a Semi-automated Fluorometric System. In: [S. l.: s. n.], 2010. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-279-7_12

VIVEIROS, M. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, [s. l.], v. 22, n. 3, 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00208-5)

VOSKUIL, M. I. et al. The Response of Mycobacterium Tuberculosis to Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 2, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00105>

W B SCHAEFER. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am Rev Respir Dis* ., [s. l.], v. 92, n. 6, p. 85–93, 1965.

WAKAMATSU, K. et al. Patients with MAC Lung Disease Have a Low Visceral Fat Area and Low Nutrient Intake. *Pulmonary Medicine*, [s. l.], v. 2015, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/218253>

WALLACE, R. J. et al. Absence of Mycobacterium intracellulare and Presence of Mycobacterium chimaera in Household Water and Biofilm Samples of Patients in the United States with Mycobacterium avium Complex Respiratory Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 51, n. 6, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00186-13>

WALLACE, R. J. et al. Clarithromycin regimens for pulmonary Mycobacterium avium complex. The first 50 patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care*

Medicine, [s. l.], v. 153, n. 6, 1996. Available at: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.6.8665032>

WAMBA, B. E. N. et al. Antistaphylococcal and Antibiotic Resistance Modulatory Activities of Thirteen Cameroonian Edible Plants against Resistant Phenotypes. *International Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 2018, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/1920198>

WAYNE LG. Classification and identification of mycobacteria. 3. Species within group 3. *Am Rev Respir Dis*, [s. l.], v. 6, n. 93, p. 1919–1928, 1966.

WHANG, J. et al. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene for identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, [s. l.], v. 70, n. 1, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.014>

WI, Y. M. Treatment of Extrapulmonary Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Infection & Chemotherapy*, [s. l.], v. 51, n. 3, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3947/ic.2019.51.3.245>

WINTHROP, K. L. et al. Incidence and Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in a Large U.S. Managed Care Health Plan, 2008–2015. *Annals of the American Thoracic Society*, [s. l.], v. 17, n. 2, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201804-236OC>

WINTHROP, K. L. et al. Nontuberculous Mycobacteria Infections and Anti–Tumor Necrosis Factor- α Therapy. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 15, n. 10, 2009. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1510.090310>

WONG, D.; CHAO, J. D.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends in Microbiology*, [s. l.], v. 21, n. 2, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.002>

WOO, P. C. Y. et al. Identification of *Mycobacterium neoaurum* Isolated from a Neutropenic Patient with Catheter-Related Bacteremia by 16S rRNA Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 38, n. 9, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3515-3517.2000>

WOODS G. *et al.* Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes [Internet]. **CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence.**, [s. l.], v. 2nd edition, n. Report No.: M24-A2., 2011

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends in Biotechnology*, [s. l.], v. 31, n. 3, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.006>

Y S PARK et al. Rapid increase of non-tuberculous mycobacterial lung diseases at a tertiary referral hospital in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis*, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 1069–1071, 2010.

Y. MAHMOOD, H. et al. Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. *Current Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 23, n. 10, 2016. Available at: <https://doi.org/10.2174/0929867323666160304150522>

YAMABA, Y. et al. Moxifloxacin resistance and genotyping of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* isolates in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*, [s. l.], v. 25, n. 12, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.05.028>

YAMAZAKI, Y. et al. *Mycobacterium avium* Genes Associated with the Ability To Form a Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 72, n. 1, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.819-825.2006>

YASIN, H. et al. Hot Tub Lung: A Diagnostic Challenge. *Cureus*, [s. l.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.1617>

YOO, J.-W. et al. Increasing Trend of Isolation of Non-Tuberculous Mycobacteria in a Tertiary University Hospital in South Korea. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, [s. l.], v. 72, n. 5, 2012. Available at: <https://doi.org/10.4046/trd.2012.72.5.409>

YOON, H. J.; CHOI, H. Y.; KI, M. Nontuberculosis mycobacterial infections at a specialized tuberculosis treatment centre in the Republic of Korea. *BMC Infectious Diseases*, [s. l.], v. 17, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2532-4>

YOON, J. H. et al. Possession of the macrophage-induced gene by isolates of the *Mycobacterium avium* complex is not associated with significant clinical disease. *Journal of Medical Microbiology*, [s. l.], v. 58, n. 2, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001958-0>

ZEHARIA, A. et al. Management of Nontuberculous Mycobacteria-Induced Cervical Lymphadenitis With Observation Alone. *Pediatric Infectious Disease Journal*, [s. l.], v. 27, n. 10, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181734fa3>

ZHANG, Q. et al. Uncovering the Resistance Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampicin Due to RNA Polymerase H451D/Y/R Mutations From Computational Perspective. *Frontiers in Chemistry*, [s. l.], v. 7, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00819>

ZHU, L. et al. Isolation, Identification, and Characterization of a New Highly Pathogenic Field Isolate of *Mycobacterium avium* spp. *avium*. *Frontiers in Veterinary Science*, [s. l.], v. 4, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00243>

ZURITA, J. et al. Characterization of the first report of *Mycobacterium timonense* infecting an HIV patient in an Ecuadorian hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, [s. l.], v. 20, n. 12, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12675>

ZWEIJPFENNING, S. M. H. et al. Failure with acquired resistance of an optimised bedaquiline-based treatment regimen for pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *European Respiratory Journal*, [s. l.], v. 54, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.00118-2019>

ZWEIJPFENNING, S.; INGEN, J.; HOEFSLOOT, W. Geographic Distribution of Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Clinical Specimens: A Systematic Review. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, [s. l.], v. 39, n. 03, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1660864>

ZWAAN, R.; VAN INGEN, J.; VAN SOOLINGEN, D. Utility of rpoB Gene Sequencing for Identification of Nontuberculous Mycobacteria in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 52, n. 7, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00233-14>

APENDICE A

TRABALHOS COMPLEMENTARES

a) Participação em eventos acadêmicos

- Mostra de experiências exitosas na atenção as pessoas com tuberculose no Rio Grande do Sul. Porto alegre, 24 de setembro do 2018. Apresentação de pôster intitulado como: “Experiência diagnóstica do Xpert MTB/RIF® narotina de um hospital no extremo sul do brasil”.
- Curso de curta duração (27 h), Whole Genome Sequencing of tuberculosis. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 16 a 18 de outubro de 2018.
- International Course on Epidemiology for Microbiology (ICEM) -Universidade Federal Fluminense (UFF). Niterói, Rio de Janeiro, 21 a 23 de outubro2019.
- 18ª Mostra da Produção Universitária e 21º encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande, 07 a 09 de outubro de 2019. Apresentação oral de trabalho intitulado: “Inibição de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Mycobacterium abscessus* resistentes aos antimicrobianos”.
- "19º Mostra da Produção Universitária e 22º encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande, 11 a 13 de novembro de 2020. Apresentação oral do trabalho intitulado: “Análise das internações hospitalares por tuberculose pulmonar no brasil entre os anos de 2015-2019”

b) Participação em outros projetos de pesquisa

- **Identificação de isolados clínicos de *M. tuberculosis* monoresistentes a isoniazida** proveniente do Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul, no período de 2010 a 2014
- **Análise do perfil de suscetibilidade de cepas de *Mycobacterium abscessus* frente a antimicrobianos frequentemente utilizados.**

c) Participação em artigos científicos

- Vianna, J. S., Machado, D., Ramis, I. B., Silva, F. P., Bierhals, D. V., Abril, M. A., von Groll, A., Ramos, D. F., Lourenço, M., Viveiros, M., & da Silva, P. (2019). The Contribution of Efflux Pumps in Mycobacterium abscessus Complex Resistance to Clarithromycin. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 8(3), 153. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030153>
- Salvato, R. S., Reis, A. J., Schiefelbein, S. H., Gómez, M. A. A., Salvato, S. S., da Silva, L. V., Costa, E. R. D., Unis, G., Dias, C. F., Viveiros, M., Portugal, I., von Groll, A., da Silva, P. E. A., Kritski, A. L., Perdigão, J., & Rossetti, M. L. R. (2021). Genomic-based surveillance reveals high ongoing transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Southern Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106401>
- Artigo de revisão em construção: “Multiple factors related to *Mycobacterium abscessus* infections: A review” (Etapa final de revisão para ser submetido).