

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES DE
MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa da Costa Flores

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES DE
MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO**

Vanessa da Costa Flores

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof. Dra. Marli Matiko Anraku de Campos

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Costa Flores, Vanessa
PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
SOBRE BIOFILMES DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO / Vanessa da Costa Flores.-2014.
74 p.; 30cm

Orientadora: Marli Matiko Anraku de Campos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. Micobactérias de crescimento rápido 2. Biofilmes
3. Antimicrobianos 4. Suscetibilidade I. Anraku de
Campos, Marli Matiko II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
SOBRE BIOFILMES DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO**

elaborada por
Vanessa da Costa Flores

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marli Matiko Anraku de Campos, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (Unifra)

Priscila de Arruda Trindade, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 28 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

Muitas vezes a correria de nossas vidas nos impede de dar atenção ao que (ou quem) realmente vale à pena. E agradecer é uma das coisas que acabam ficando esquecidas. Por mais palavras que se escreva, estas não serão suficientes para demonstrar todo meu agradecimento às pessoas que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial, agradeço:

Aos meus pais, por tudo que me proporcionaram, pelo amor incondicional, pelo carinho, pelo afeto e pelo apoio. Não encontro palavras para agradecer, simplesmente me sinto envolvida por um enorme sentimento: gratidão. Vocês são minha fortaleza.

Aos meus irmãos Édio e Rafael, por serem meus primeiros amigos e estarem sempre presentes em todos os momentos.

Ao Benjamin, por ser tão importante em minha vida, sempre me instigar a crescer profissionalmente e me valorizar tanto como pessoa. Obrigada por dividir comigo as alegrias e angústias. Obrigada por todo amor e paciência.

Aos meus sobrinhos Lorenzo e Nicolý, por encherem minha vida de luz, alegria e amor.

Aos meus avós, que sempre me incentivaram e me deram carinho para continuar seguindo em frente na constante busca pelo conhecimento.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos meus sinceros agradecimentos pela confiança, apoio e carinho. Minha admiração pelo exemplo de profissionalismo e por todo o tempo despendido auxiliando minha formação.

Às queridas colegas do Laboratório de Micobacteriologia: Pauline, Vanessa, Caren, Grazielle, Bianca, Tanise e Jaciane, pelas experiências compartilhadas.

Ao Fallon, pela amizade, sua imensa disposição em ajudar e por todo apoio prestado em todas as etapas deste trabalho.

À minha pequena Lisa, por fazer meus dias mais alegres e por ajudar a descarregar a ansiedade e eventuais maus fluidos que sobram em alguns dias.

Ao Zaroni Segala, que gentilmente cedeu materiais essenciais a realização deste trabalho, facilitando a logística dos experimentos.

À Dr^a. Luciana Nunes, pelas informações compartilhadas e pelo fornecimento das cepas de micobactérias para o estudo.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por contribuírem com minha formação;

Aos amigos da secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT-UFSM) pela ajuda prestada e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas (HUSM), pela cordial recepção em seu ambiente de trabalho e por sempre estarem dispostos a ajudar quando precisei de apoio técnico.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade desta realização profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

AUTORA: Vanessa da Costa Flores
ORIENTADORA: Marli Matiko Anraku de Campos
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de março de 2014.

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) são patógenos humanos oportunistas que estão presentes no meio ambiente. Quando em biofilmes, as micobactérias são altamente resistentes aos tratamentos antibacterianos. A compreensão de fatores causadores de falência de tratamentos das micobacterioses, como a formação de biofilmes, contribui para a elucidação do potencial patogênico e da resistência aos fármacos apresentados por esses microrganismos. Foram testados os antimicrobianos amicacina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol, normalmente empregados no tratamento de micobacterioses. Para cada fármaco, avaliou-se a suscetibilidade do microrganismo, a capacidade de inibição da formação de biofilmes e a resistência dos biofilmes à atuação antimicrobiana. Os resultados demonstraram que, embora os antimicrobianos testados sejam empregados como alternativa terapêutica para MCR, *Mycobacterium abscessus* apresentou-se resistente à claritromicina e *Mycobacterium massiliense* exibiu perfil resistente à claritromicina e ao sulfametoxazol. Além disso, a inibição da formação de biofilmes e a destruição dos mesmos não foram totalmente alcançadas. Os perfis encontrados reforçam a necessidade da determinação da suscetibilidade aos medicamentos. Tendo-se em vista que os biofilmes constituem uma forma conhecida de resistência bacteriana, o insucesso de alternativas para inibir a formação ou ainda destruir biofilmes pode desencadear a recorrência de infecções.

Palavras-chave: Micobactérias de crescimento rápido, biofilmes, antimicrobianos, suscetibilidade.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Posgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

SUSCEPTIBILITY PROFILE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF RAPIDLY GROWING MYCOBACTERIA BIOFILMS

AUTHOR: Vanessa da Costa Flores
ADVISER: Marli Matiko Anraku de Campos
Presentation date: Santa Maria, March 28th 2014.

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic human pathogens that are present in our environment. When in biofilms form, mycobacteria are highly resistant to antibacterial treatments. The comprehension of factors that cause mycobacteriosis treatments to fail, e.g., biofilm formation, contributes to the elucidation of the pathogenic potential and the drug resistance shown by these microorganisms. The tested antimicrobials were amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem and sulfamethoxazole, which are ordinarily employed in the treatment of mycobacteriosis. For each drug, it was evaluated the susceptibility of the pathogen, the ability to inhibit biofilm formation and the resistance of biofilms to antimicrobial activity. Results showed that although the tested antimicrobials are used as an alternative therapy for RGM, *Mycobacterium abscessus* presented to be resistant to clarithromycin and *Mycobacterium massiliense* showed a resistant profile to clarithromycin and sulfamethoxazole. Furthermore, the inhibition of biofilm formation and its destruction have not been fully met. The susceptibility profiles found emphasize the need for the determination of drug sensitivity. Considering that the biofilms are a known form of bacterial resistance, the failure of alternatives to inhibit or destroy biofilms can trigger the recurrence of infections.

Keywords: Rapidly growing mycobacteria, biofilms, antimicrobial, susceptibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cultura de micobactérias em meio sólido	19
Figura 2 - Lesão cutânea causada por <i>M. abscessus</i>	23
Figura 3 - Infecções pós-cirúrgicas causadas por MCR em estados brasileiros	25
Figura 4 - Biofilme de <i>M. smegmatis</i> cultivado em meio de cultura M63	35
Figura 5 - Processos envolvidos na formação de biofilmes	36
Figura 6 - Mecanismos de resistência a antimicrobianos em biofilmes	38

MANUSCRITO

Figure 1 - Effect of different concentrations of amikacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	53
Figure 2 - Effect of different concentrations of ciprofloxacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	54
Figure 3 - Effect of different concentrations of clarithromycin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	55
Figure 4 - Effect of different concentrations of doxycycline on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	56
Figure 5 - Effect of different concentrations of imipenem on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	57
Figure 6 - Effect of different concentrations of sulfamethoxazole on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon	21
Tabela 2 - Funções de substâncias poliméricas extracelulares no biofilme bacteriano	34

MANUSCRITO

Table 1 - Breakpoints for the rapidly growing mycobacteria	59
Table 2 - Standard susceptibility <i>in vitro</i> of <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> and <i>M. massiliense</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAR	Álcool-Ácido Resistência
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	American Thoracic Society
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMDB	Concentração Mínima de Destruição do Biofilme
CMIB	Concentração Mínima de Inibição de Biofilme
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
GPL	Glicopeptídeos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
LJ	Löwenstein-Jensen
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
TB	Tuberculose
TS	Teste de Suscetibilidade
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Comprovante de submissão do manuscrito para publicação no periódico Antimicrobial Agents and Chemotherapy.....	72
---	----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Resumos Publicados em Congressos.....	74
--	----

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 INTRODUÇÃO	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1 Gênero <i>Mycobacterium</i>	18
4.2 Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)	19
4.3 Classificação de Micobactérias Não Tuberculosas	20
4.4 Micobacterioses	22
4.5 Epidemiologia de Micobacterioses	24
4.6 Tratamento das Micobacterioses	26
4.6.1 Amicacina	27
4.6.2 Claritromicina	28
4.6.3 Ciprofloxacino	28
4.6.4 Doxiciclina	29
4.6.5 Imipenem	30
4.6.6 Sulfametoxazol	30
4.7 Testes de Suscetibilidade	31
4.8 Biofilmes	32
4.9 Estrutura e composição dos biofilmes	33
4.10 Processos envolvidos na formação de biofilmes	34
4.11 Resistência associada à presença de biofilmes	37
4.12 Biofilmes formados por micobactérias	39
5 MANUSCRITO	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61

1 APRESENTAÇÃO

A **INTRODUÇÃO** consiste de uma breve apresentação sobre o assunto investigado e sua relevância. No segmento **REVISÃO DA LITERATURA**, está descrito uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **MANUSCRITO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, encontram-se no manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

As **REFERÊNCIAS** remetem somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO DA LITERATURA** desta dissertação.

2 INTRODUÇÃO

As Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) encontram-se dispersas na natureza, e podem colonizar o organismo humano e determinar o aparecimento de infecções ou doenças (ZAMARIOLI et al., 2008). MNT são isoladas a partir de diversas partes do organismo como a pele, ouvido externo, narinas, orofaringe, gengivas, vagina, genitália externa tanto masculina como feminina, saliva, fezes, urina, além do escarro (LOPES et al., 2005).

Muitos estudos têm relatado o aumento do número de casos de infecções oportunistas causadas por espécies de MNT, principalmente Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) (BRASIL, 2009). As MCR se destacam como patógenos emergentes com expressivo potencial para causar infecções em pacientes imunodeprimidos e formar biofilmes (JEONG et al., 2004).

As micobacterioses, doenças causadas por MNT, apresentam tratamento bastante complexo, uma vez que elas são naturalmente resistentes ou têm pouca sensibilidade aos fármacos tuberculostáticos. Esta sensibilidade difere entre as espécies e entre cepas de uma mesma espécie. Por esta razão, muitos são os esquemas utilizados para o tratamento. Em um tratamento eficiente, é necessária inicialmente a identificação do agente causal, para que - de acordo com a sua suscetibilidade - sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados (WILDNER et al., 2011).

A resistência à terapêutica antimicrobiana parece envolver vários fatores (PÉRES et al., 2011). Entre os mecanismos de resistência as drogas em micobactérias, encontram-se o papel da parede celular desses microrganismos, a biotransformação de fármacos no meio intracelular, mutações genéticas adquiridas, bombas de efluxo e a formação de biofilmes (VAN INGEN et al., 2012a; VAN INGEN et al., 2012b).

Muitas espécies de micobactérias formam biofilmes, que são comunidades estruturadas, em interfaces ar-líquido e com adesão às superfícies sólidas (OJHA & HATFULL, 2007). A relação das micobactérias com a formação de biofilmes tem sido observada há décadas em amostras clínicas e ambientais. Essas estruturas são consideradas importantes fontes de infecções, devido à sua resistência aumentada a antimicrobianos (ESTEBAN et al. 2008).

As infecções causadas por micobactérias têm sido consideradas uma emergência epidemiológica e sua investigação é uma prioridade para controlar as doenças associadas que podem levar a quadros extremos e incapacidades. A grande variabilidade de infecções oportunistas causadas por espécies de micobactérias têm causado não apenas casos

infecciosos graves, como impuseram extensa dificuldade para o manejo dessas situações por parte dos profissionais da saúde.

As altas taxas de morbi-mortalidade associadas a algumas espécies de MNT são agravadas pelas dificuldades encontradas na implementação do tratamento e obtenção de dados epidemiológicos locais precisos. O aumento de casos de co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e micobacterioses tem evidenciado a necessidade de se conhecer e entender melhor as particularidades das MCR.

Devido à variabilidade comportamental demonstrada por MCR, como o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos e a processos de esterilização, os protocolos terapêuticos para a supressão do quadro clínico instalado podem se apresentar ineficazes. A compreensão de fatores genéticos e fisiológicos causadores de falência de tratamentos das micobacterioses, como a formação de biofilmes, contribui para a elucidação do potencial patogênico e da resistência a fármacos apresentados por esses microrganismos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil de suscetibilidade e atividade antimicrobiana sobre biofilmes de MCR.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar o perfil de suscetibilidade de MCR frente a antimicrobianos amplamente empregados no tratamento de micobacterioses.

3.2.2 Avaliar a atuação antimicrobiana na inibição da formação de biofilmes de MCR.

3.2.3 Avaliar o efeito antibiofilme de antimicrobianos sobre biofilmes de MCR.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é constituído de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pertencentes à ordem Actinomycetales, subordem Corynebacteriacea, família Mycobacteriaceae (SHINNICK & GOOD, 1994). Este gênero é formado pelo *Mycobacterium leprae*, por espécies altamente patogênicas que compõem o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), e por outras espécies denominadas MNT (COSMA et al., 2003; UEKI et al., 2005).

O estudo das micobactérias confunde-se com o próprio surgimento da microbiologia clínica. O primeiro agente etiológico de doença humana foi descrito por Hansen, em 1868, e, em 1882, Koch demonstrou a associação entre a presença de microrganismos e a ocorrência da tuberculose (TB). Viviam-se uma nova era no desenvolvimento da ciência e as infecções por bactérias que mais tarde receberiam os nomes *M. leprae*, agente causador da lepra ou hanseníase, e *M. tuberculosis*, agente etiológico da TB (MACEDO et al., 2009).

Em 1896, Lehmann e Neumann, visando à inclusão dos bacilos da TB e da hanseníase, propuseram a criação do gênero *Mycobacterium* (WILDNER et al., 2011). Posteriormente, outras bactérias foram acrescentadas ao gênero e somente na década de 50 foi demonstrada a importância das MNT como causadoras de doença no homem (KANAI, 2006).

As micobactérias são bacilos aeróbicos não formadores de esporos. Apresentam-se como bacilos retos ou ligeiramente curvos, medindo de 0,2 a 0,4 µm de largura e 1 a 10 µm de comprimento. Muitas características desses microrganismos como a álcool-ácido resistência (AAR), a resistência a antimicrobianos e desinfetantes químicos, a resistência à dessecação e a patogenicidade estão relacionadas à parede celular, que é rica em ácidos micólicos (CARDOSO, 2009; MARTÍNEZ et al., 1999). A propriedade AAR é evidenciada pela técnica de Ziehl-Neelsen, a qual demonstra a resistência das células microbianas coradas pela fucsina à descoloração com mistura álcool-ácida (CARDOSO, 2009; HINRICHSEN, 2007).

Os ácidos micólicos presentes na camada externa da parede celular, encontrados apenas no gênero *Mycobacterium*, formam uma camada cérea resistente à água. Os nutrientes entram lentamente na célula por essa camada, o que contribui para a taxa de crescimento lento

de algumas micobactérias (CARDOSO, 2009; HINRICHSEN, 2007). Outra importante característica que contribui para o crescimento lento das micobactérias deve-se à sua superfície celular hidrofóbica. A hidrofobicidade faz com que os microrganismos se agrupem e, assim, os nutrientes não são facilmente acessíveis às células (SILVA, 2013).

A parede celular é uma característica definidora de micobactérias. Esta estrutura hidrofóbica complexa e rica em lipídios é responsável pela morfologia distinta das colônias e resistência aos antimicrobianos. Os componentes da parede celular contribuem para a virulência, a persistência no interior de macrófagos e a modulação da resposta imune do hospedeiro. A morfologia das colônias é um complexo fenótipo influenciado pela comunicação entre as células e pode estar relacionada com a suscetibilidade aos antimicrobianos (CHEN et al. 2006; SHI et al., 2011).

A temperatura ótima de crescimento para as micobactérias varia consoante a espécie e pode ser entre 30°C e 45°C, e as variações de pH suportadas são limitadas entre 6 e 8. A morfologia das colônias varia conforme a espécie de micobactéria e pode se apresentar arredondada, de superfície lisa ou irregular, de aspecto seco ou úmido, de consistência mucóide e de não pigmentada a pigmentada (SUTRE, 2010). O pigmento pode ser amarelo, laranja ou, raramente róseo (SILVA, 2013).

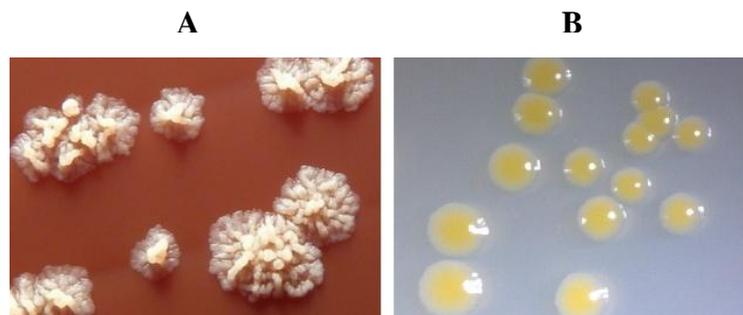


Figura 1: Cultura de micobactérias em meio sólido. (A) Colônias rugosas sem pigmentação e (B) colônias lisas e pigmentadas. Adaptado de *Bacteria in Photos*, disponível em: [http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium %20fortuitum.html](http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium%20fortuitum.html).

4.2 Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)

São conhecidas mais de 120 espécies de MNT, onde aproximadamente um terço está associada a doenças em humanos. As MNT, ao contrário das espécies do CMTB, apresentam

patogenicidade variável (TORTOLI, 2003; ZAMARIOLI et al., 2008). A presença das MNT em patologias humanas foi descrita pela primeira vez em 1893, não muito distante da descoberta do *M. tuberculosis* por Robert Koch. Subsequentemente, numerosos relatos corroboraram o papel de patógeno humano dessas espécies (MARRAS & DALEY, 2002).

As MNT - também chamadas micobactérias atípicas, micobactérias ambientais ou micobactérias oportunistas - normalmente não são contagiosas e o homem não é o hospedeiro de escolha. As infecções ocorrem de forma oportunista, já que estas são ubíquas no ambiente. Assim, as fontes ambientais, como inoculação por meio de traumas, inalação de aerossóis, e instrumentos contaminados são as formas mais frequentes da sua transmissão (FONSECA et al., 2008; MARINHO et al., 2008; MOTA, 2011). Têm sido isoladas a partir de água de abastecimento público e constituem um problema de esterilização de instrumentos cirúrgicos e outros materiais hospitalares, pois toleram altas temperaturas e são resistentes a métodos padrões de descontaminação (ATS, 2010). Devido à sua resistência intrínseca ao cloro e a outros desinfetantes químicos utilizados para tratamento de água, as micobactérias têm sido capazes de colonizar uma ampla extensão de superfícies em hospitais, fábricas e áreas residenciais (BLAND et al., 2005).

4.3 Classificação de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)

Em 1959, Runyon propôs uma classificação para as micobactérias diferentes de *M. tuberculosis*, agrupando-as com base nas suas características morfológicas, o tempo de crescimento e a produção ou não de pigmentos após exposição à luz e/ou na obscuridade. Reconhecem-se assim quatro grupos: I, II, III e IV. Os três primeiros grupos englobam as espécies de crescimento lento (superior a uma semana), enquanto o último grupo inclui as espécies que se desenvolvem em menos de uma semana (crescimento rápido) (TORTOLI, 2006; MOTA, 2011).

Os três primeiros grupos distinguem-se entre si pela produção de pigmento. As estirpes do grupo I (fotocromogênicas) apenas produzem pigmento após exposição à luz; as do grupo II (escotocromogênicas) produzem pigmento independentemente da exposição à luz; as do grupo III (não cromogênicas) nunca produzem pigmento na obscuridade, mas por vezes podem pigmentar-se ligeiramente, de amarelo ou rosa sob o efeito da luz (TORTOLI, 2006; MOTA, 2011).

Tabela 1: Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon. Adaptado de Fontana (2008).

Grupos	Espécies	Tempo de Crescimento
Grupo I	<i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	Lento
Grupo II	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>	Lento
Grupo III	Complexo <i>M. avium</i> <i>M. malmoeense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. ulcerans</i>	Lento
Grupo IV	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. massiliense</i>	Rápido

O tempo de crescimento é definido como o tempo necessário para as colônias serem visualizadas a olho nu, em meio sólido (BRASIL, 2004). Em relação ao tempo de crescimento, as micobactérias podem ser classificadas em dois grupos: micobactérias de crescimento lento (MCL) e MCR. O CMTB e o MAC são agrupados como MCL. O segundo grupo, representado pelas MCR, inclui principalmente as espécies saprófitas encontradas no solo e na água. Muitas espécies de MCR são patógenos oportunistas, podendo causar desde abscessos localizados, até doenças pulmonares e disseminadas (CARDOSO, 2009).

Entre as MCR encontram-se as espécies *M. abscessus* e *M. fortuitum*, que causam um amplo espectro de doenças tais como doença pulmonar, linfadenopatia e infecções dos tecidos moles (HUANG et al., 2013). Recentemente, devido à diferença de fenótipos de resistência a antimicrobianos, a espécie *M. abscessus* foi subclassificada em três novas espécies estreitamente relacionadas: *M. abscessus sensu stricto* (ss), *M. massiliense* e *Mycobacterium bolletii* (RACHID et al., 2012).

As micobactérias podem, ainda, serem classificadas conforme a capacidade da espécie de causar doença no homem, em (a) patogênicas - obrigatoriamente causam infecções;(b)

potencialmente patogênicas - podem causar doenças; e (c) raramente patogênicas - nunca ou com extrema raridade causam enfermidades. Exclusivamente entre as MNT, as micobactérias são classificadas em (a) potencialmente patogênicas e (b) raramente patogênicas (BRASIL, 2008; CARDOSO, 2012).

A diferenciação fenotípica entre espécies do gênero *Mycobacterium* pode ser realizada através de testes bioquímicos em que as colônias são submetidas às provas de: inibição do crescimento em meio contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB), teste da niacina, crescimento a 25°C, crescimento a 45°C, inibição do crescimento em meio contendo NaCl 5%, hidrólise do tween 80, produção de β -galactosidase, redução do telurito de potássio, redução do nitrato, produção de urease e pirazinamidase (BRASIL, 2008).

O poder discriminatório dos testes bioquímicos pode ser limitado em algumas situações, sobretudo na identificação de MCR. Desse modo, é ressaltada a importância dos métodos moleculares como ferramentas auxiliares na identificação das MNT, destacando-se ainda o potencial de reduzir para horas, ao invés de dias e até mesmo semanas, a identificação das espécies pelos métodos moleculares (BRASIL, 2004).

4.4 Micobacterioses

As MNT são responsáveis por infecções de pele e tecidos moles, infecções pulmonares, crônicas e progressivas, linfadenite cervical pediátrica e infecções disseminadas, especialmente em casos avançados da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A imunossupressão é um fator de risco para sua disseminação, embora muitos pacientes com micobacterioses não sejam imunossuprimidos (WILDNER et al., 2011).

Fatores de risco para o acometimento de infecção por MNT incluem exposição ocupacional a poeiras e fibrose cística. Recentemente, foi demonstrado que mulheres idosas, de cor branca e com um índice de massa corporal baixo (IMC), possuem alto risco para desenvolver infecção pulmonar causada por micobactérias atípicas (MULLIS & FALKINHAM, 2013).

O pulmão é o principal órgão acometido pelas MNT. A doença pulmonar ocorre pela inalação de aerossóis contendo os bacilos, geralmente em pacientes com doença pulmonar pré-existente. Nestes casos a avaliação clínica é complexa, pois os sinais e os sintomas são

variáveis, inespecíficos e similares aos da TB. Os pacientes geralmente apresentam sintomas como tosse crônica com expectoração, fadiga, febre, hemoptise e perda de peso (SÃO PAULO, 2005).

A doença pulmonar por MNT geralmente ocorre em pacientes com doença pulmonar crônica como pneumoconiose, doença pulmonar obstrutiva crônica, TB pré-existente, bronquite crônica, bronquiectasia e doença esofágica associada à aspiração crônica de material alimentar pelas vias aéreas. Avaliação clínica é frequentemente complicada devido à similaridade da sintomatologia com as doenças pulmonares pré-existentes (ATS, 1997; KOH et al., 2002).

Outras manifestações clínicas de infecções causadas por MNT podem ser causadas devido a infecções peritoneais por cateterização; infecções pós-cirúrgicas, como em mamoplastias e transplantes cardíacos; em decorrência de procedimentos invasivos, como videoscopias, e procedimentos estéticos (PADOVEZE et al., 2007).

As infecções de pele e tecido subcutâneo causadas por MCR se apresentam, em geral, como abscessos piogênicos, com reação inflamatória aguda e supuração. As espécies mais comumente associadas a doenças de pele e tecido subcutâneo incluem *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, e estas são responsáveis pela formação de abscessos nos locais de punção, ferimentos ou fraturas expostas. Geralmente as lesões ocorrem após traumatismos, fraturas ou injeções, após cirurgias ou procedimentos hospitalares onde os dispositivos médicos podem estar contaminados. Infecções ocorrem também após ferimento acidental onde a ferida é contaminada pelo solo (FONTANA, 2008).



Figura 2: Lesão cutânea causada por *M. abscessus* (GALIL et al., 1999).

4.5 Epidemiologia de Micobacterioses

Com o advento do tratamento para a TB, em 1950, a cultura das amostras tornou-se rotina e verificou-se que alguns dos casos aparentes de TB eram afinal devidos a MNT. Tem-se verificado um aumento dramático na prevalência de infecções por micobactérias atípicas desde então. Há relatos mundiais do aumento da incidência de MNT observada pelo número de isolamentos realizados nos laboratórios, com conseqüente diversificação das espécies identificadas após o avanço das técnicas moleculares (GRIFFITH et al., 2007; MARINHO et al., 2008). Estudos mostram que há uma variabilidade geográfica marcante tanto na prevalência quanto na distribuição das espécies responsáveis pelas doenças causadas por micobactérias (ZAMARIOLI et al., 2008).

A incidência de micobacterioses humanas aumentou rapidamente após a emergência da AIDS em todo o mundo, no início da década de 1980 (SUEHIRO, 2008). Durante a década de 1990, a análise dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças mostrou um grande aumento dramático de MNT isoladas para níveis ainda mais elevados do que o *M. tuberculosis*. *Mycobacterium gordonae* e *M. fortuitum* foram identificadas em 18% e 5% dos isolados, respectivamente (MARTINEZ et al., 2007).

Um estudo de vigilância canadense relatou um aumento na incidência de micobacterioses em crianças, especialmente em crianças imunodeprimidas e com apresentações clínicas mais graves. Descobertas similares também foram relatadas na Escandinávia. No entanto, ainda não está claro se esse aumento é real ou apenas reflete melhor o reconhecimento do espectro clínico das micobacterioses. As taxas de incidência anual de MNT em diferentes países variam entre 0,30 - 0,87 casos a cada 100.000 crianças (OBIHARA et al., 2011).

As MCR são encontradas principalmente em fontes ambientais. Em sua maioria, os estudos de surtos apresentam evidência de procedimentos inadequados de esterilização e/ou desinfecção, criando condições favoráveis à ocorrência desses eventos (PITOMBO et al., 2009). A frequente presença desses microrganismos na água de torneira de hospitais, a relativa resistência a agentes esterilizantes, sua habilidade em sobreviver e crescer em água destilada e dentro de amebas, bem como seu frequente envolvimento na formação de biofilmes contribuem para que espécies de MCR causem infecções relacionadas a assistência a saúde (CARDOSO, 2009; SEXTON & HARRISON, 2008).

No Brasil, poucos são os dados oficiais referentes às micobacterioses (WILDNER, 2012). Devido à ocorrência de surtos de infecções causadas por micobactérias, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou, em 2009, a notificação compulsória das infecções causadas por MCR. Dentre as MNT, as espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, classificadas como MCR, são grandes responsáveis pelos surtos de infecções notificadas no país (BRASIL, 2007; BRASIL, 2009). O agente etiológico mais prevalente na maioria das cidades brasileiras é a espécie *M. massiliense*, exceto nas infecções secundárias a mamoplastias, onde a maior prevalência é de *M. fortuitum* (SÃO PAULO, 2010).

Um estudo realizado por Leão et al. (2010) descreveu surtos causados por micobactérias após procedimentos cirúrgicos ocorridos em sete estados do Brasil, conforme demonstrado na figura 4. Os resultados revelaram que um clone de *M. abscessus* estava associado com uma epidemia prolongada de infecções pós-cirúrgicas nos locais em que a pesquisa foi realizada. O que sugere que a espécie está amplamente distribuída e adaptada no território brasileiro, causando infecções em indivíduos suscetíveis.

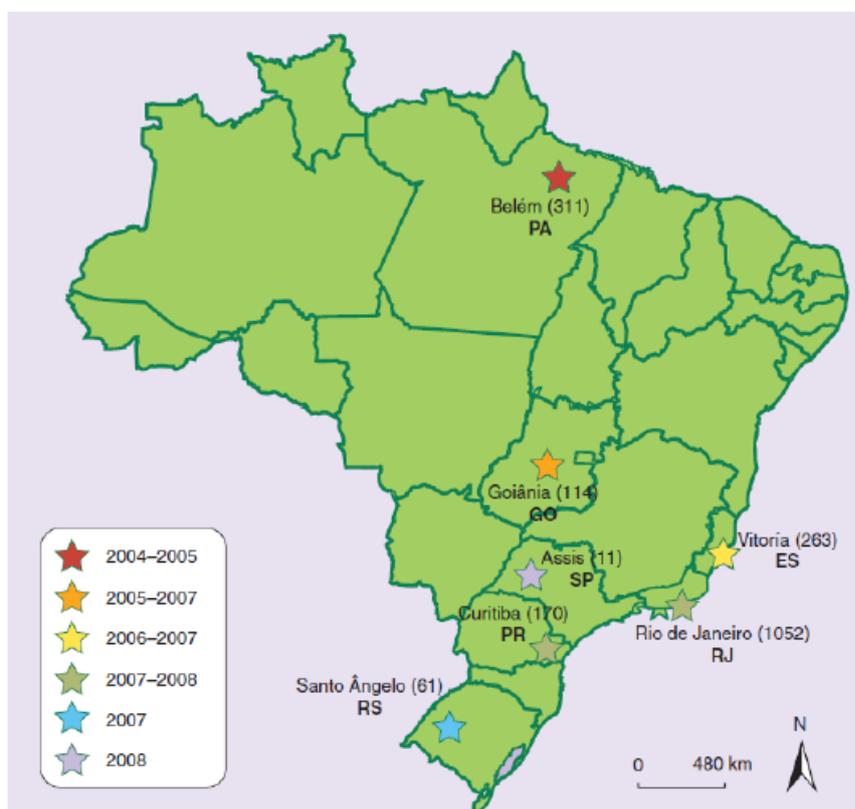


Figura 3: Infecções pós-cirúrgicas causadas por MCR em sete estados brasileiros (LEÃO, 2010).

A maior epidemia de infecção pós-cirúrgica causada por MNT documentado no Brasil foi relatada por Duarte et al. (2009). Em estudo desenvolvido no Rio de Janeiro (RJ), os autores relataram a existência de um clone epidêmico de *M. massiliense* circulando no país, de modo que as cepas oriundas de Belém, Goiás e Rio de Janeiro apresentaram perfis idênticos detectados em genotipagem por eletroforese em gel em campo pulsado. Além disso, 38 hospitais do Rio de Janeiro tiveram casos confirmados por culturas microbiológicas, totalizando 148 isolados de *M. massiliense* tolerantes ao glutaraldeído a 2%.

Em Santa Maria, RS, foi realizado um estudo em que se avaliou a prevalência de MNT em relação ao total de casos de micobacterioses identificadas em pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), em um período de três anos. Os resultados evidenciaram que 33% dos casos clínicos investigados foram causados por MNT, sendo que 18% da totalidade de casos pertenciam ao grupo de MCR (AGERTT et al., 2013).

Portanto, é imprescindível compreender as associações entre os casos de micobacterioses e as espécies causadoras de implicações clínicas. No Brasil, as infecções causadas por micobactérias têm aumentado e causado surtos em hospitais, principalmente quando relacionados a procedimentos cirúrgicos (SENNA et al., 2008; CARDOSO, 2012).

4.6 Tratamento das Micobacterioses

A resistência aos antimicrobianos é um tema de destaque quando se estudam as micobactérias. Estão presentes as dificuldades conhecidas, semelhantes àquelas que se apresentam no tratamento da TB, em especial a proteção que as bactérias obtêm por se alojarem dentro das células do hospedeiro, o que exige fármacos que alcancem tais sítios (MACEDO et al., 2009).

Embora os fármacos antituberculose sejam amplamente utilizadas para prevenir o desenvolvimento de TB, tal terapia para MNT só é recomendado em pacientes com doença avançada por HIV. Infelizmente, não existe nenhuma vacina disponível para a prevenção de infecções por micobactérias ambientais. Existem, contudo, vários relatos de que a vacina para a TB, constituída do Bacilo de Calmette e Guérin (BCG), oferece alguma proteção contra a infecção por MNT em crianças (ATS, 2010).

Muitos são os esquemas utilizados para o tratamento das MNT, entretanto, ainda são poucos os estudos randomizados relacionados a este tema para grande parte das espécies. Sabe-se que para alguns fármacos e espécies, não há correlação da suscetibilidade *in vitro* com a resposta efetiva aos antimicrobianos *in vivo* (GRIFFITH, 2010). As orientações terapêuticas baseiam-se em estudos retrospectivos, com poucos casos e muitas vezes não comparáveis (SÃO PAULO, 2005). A maioria dos isolados clínicos das micobactérias atípicas é resistente a quase todos os medicamentos testados em concentrações clínicas estabelecidas para o *M. tuberculosis* (VICENTE, 2003).

Em um tratamento eficiente, é necessário inicialmente a identificação do agente causal, para que, de acordo com a sua suscetibilidade, sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados. Devem ser combinados pelo menos dois fármacos, visando evitar a seleção de cepas resistentes. O número de fármacos utilizados deve ser mantido por todo o tempo de tratamento, o qual não deve ser inferior a 18 meses. Dentre as micobactérias mais resistentes estão as do MAC, *M. fortuitum* e *M. chelonae*, que exigem, com frequência, poliquimioterapia com quatro a cinco fármacos (VICENTE, 2003).

Os antimicrobianos utilizados em infecções causadas por MNT incluem amicacina, azitromicina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, etambutol, imipenem, isoniazida, rifabutina e sulfametoxazol, entre outros. A estratégia terapêutica depende do agente etiológico, localização, extensão do acometimento das lesões e a presença ou não de co-morbidades (BRASIL, 2009; BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

4.6.1 Amicacina

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ao ligar-se de maneira irreversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular (ZHANG, 2005) e são utilizados, principalmente, em casos de resistência a claritromicina (SÃO PAULO, 2005). A amicacina, fármaco pertencente à classe dos aminoglicosídeos, é um composto semissintético derivado da canamicina, sendo utilizada desde 1972. É um fármaco bactericida, e sua ação é concentração dependente e residual, ou seja, pode apresentar efeito bactericida mesmo com a concentração sérica abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) (ARBEX et al., 2010).

A amicacina é prescrita em tratamentos de infecções por MCR, sendo aplicada como alternativa terapêutica em: lesões múltiplas ou individuais na pele e região subcutânea; infecções profundas (acometimento de fáscia, músculos, intra-peritônio); artrite e osteomielite; infecções secundárias a mamoplastia de aumento. Nesses casos, a amicacina pode ser aplicada em terapias com a duração de até seis meses, de acordo com a evolução do caso. A posologia do medicamento é ajustada conforme o local acometido e a extensão das lesões. Além disso, recomenda-se atenção especial à nefro e a neurotoxicidade (BRASIL, 2009).

4.6.2 Claritromicina

A claritromicina é um agente antimicrobiano macrolídeo sistêmico e semi-sintético que apresenta propriedade bacteriostática contra microrganismos suscetíveis, embora também possa ser bactericida em altas concentrações. A claritromicina tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da síntese de proteínas, penetrando a parede celular e ligando-se às subunidades ribossomais 50S, interrompendo a síntese de proteínas em organismos sensíveis (KANATANI & GUGLIELMO, 1994).

No tratamento de infecções provocadas por MCR, a claritromicina é empregada nas mesmas lesões em que o uso da amicacina é recomendado (BRASIL, 2009). Entre os microrganismos em que a claritromicina tem seu uso aplicado encontra-se: *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. peregrinum* e *M. massiliense* (BRASIL, 2009; SÃO PAULO, 2005).

4.6.3 Ciprofloxacino

O ciprofloxacino é uma fluorquinolona de segunda geração vastamente prescrita, apresenta amplo espectro de ação e é eficaz contra diversos patógenos, incluindo Gram-negativos, Gram-positivos e micobactérias (ANDREU, et al., 2007; BRASIL, 2009).

O mecanismo de ação do ciprofloxacino decorre do bloqueio de DNA girase, resultando em efeito bactericida contra amplo espectro de bactérias (ANVISA, 2013a). A inibição da atividade da DNA girase bacteriana, que regula a topologia do DNA é essencial à sobrevivência da bactéria. A DNA girase torna a molécula de DNA bacteriana compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA deixa de possuir a propriedade de super-helicoidização para que possa ocupar um pequeno espaço celular para sua expressão, recombinação e replicação. As extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada de RNAm e de proteínas, assim como a produção de exonucleases e a degradação cromossomal. Esses fatores levam à morte celular (ARBEX, et al., 2010).

O ciprofloxacino é uma opção importante no tratamento de infecções causadas por micobactérias como *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. massiliense*, *M. chelonae* e *M. abscessus* e, também é considerado uma alternativa terapêutica em casos de resistência a claritromicina (BRASIL 2009; SÃO PAULO, 2005).

4.6.4 Doxiciclina

A doxiciclina é uma tetraciclina semi-sintética que possui ação prolongada e atua como um agente bacteriostático sendo altamente eficaz contra muitos microrganismos. Seu mecanismo de ação se baseia na capacidade que o fármaco possui de se ligar à subunidade 30S dos ribossomos microbianos, bloqueando a ligação da RNA-aminoacil transferase, inibindo a síntese de proteínas (KRAKAUER & BUCKLEY, 2003).

A doxiciclina apresenta elevado grau de lipossolubilidade e alcança elevada concentração sanguínea e tecidual, penetrando rapidamente na maioria das células (ANVISA, 2013b).

No tratamento de micobacterioses, a doxiciclina é amplamente empregada, incluindo o tratamento de infecções causadas por MCR como *M. fortuitum*, *M. massiliense* e *M. abscessus* (BRASIL, 2009).

4.6.5 Imipenem

O imipenem é um antimicrobiano sintético do grupo dos carbapenêmicos, que constituem uma classe de antibióticos betalactâmicos, e é um importante agente no arsenal terapêutico de infecções causadas por diversos microrganismos (FREITAS & BARTH, 2002). A estabilidade diante das betalactamases o diferencia de outros betalactâmicos. O imipenem é um potente inibidor da síntese da parede celular bacteriana e é bactericida contra um amplo espectro de patógenos. Liga-se às proteínas fixadoras de penicilina presentes na parede bacteriana, principalmente as PBPg1 e PBP2, provocando a lise osmótica da bactérias. (ANVISA, 2013c).

Para manter sua atividade antibacteriana e diminuir sua nefrotoxicidade é recomendado que o imipenem seja coadministrado com a cilastatina, que bloqueia o metabolismo renal do imipenem e aumenta substancialmente sua concentração no trato urinário (GALES & MENDES, 2002).

Em infecções causadas por MCR o imipenem é bastante utilizado, pois usualmente esses microrganismos são sensíveis ao antimicrobiano. Nos testes de suscetibilidade, o imipenem não deve ser avaliado rotineiramente, em função de sua labilidade durante a incubação (BRASIL, 2009; CLSI, 2011).

4.6.6 Sulfametoxazol

O sulfametoxazol é uma sulfonamida de amplo espectro. As sulfonamidas foram os primeiros fármacos antibacterianos sistêmicos eficazes utilizadas em humanos. Elas são primariamente bacteriostáticas e atuam interferindo na síntese bacteriana do ácido fólico (GARCÍA-GALÁN et al., 2008).

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido p-aminobenzóico (PABA) impedindo a sua utilização pelas bactérias na síntese do ácido fólico. Os microrganismos sensíveis são aqueles que exigem a presença do PABA para sintetizar seu próprio ácido fólico (FORGACS et al., 2009).

No controle de infecções causadas por algumas MCR, como *M. abscessus* e *M. fortuitum*, o sulfametoxazol é uma alternativa importante no tratamento devido à facilidade de administração por via oral (BRASIL, 2009).

4.7 Testes de Suscetibilidade

A avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em espécies do gênero *Mycobacterium* é importante no manejo de pacientes com infecções causadas por MNT. Para auxiliar na padronização de métodos utilizados para estabelecer o perfil de suscetibilidade de micobactérias, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) publicou o documento M24-A2, contendo padronizações para testar MNT (CLSI, 2011).

O CLSI (2011) recomenda como padrão-ouro a microdiluição em caldo para a realização do teste de suscetibilidade (TS). O teste pode ser aplicado em qualquer MCR com significado clínico (isolados de sangue, líquidos corporais estéreis, tecidos, e amostras oriundas de lesões de pele e tecidos moles). Os agentes antimicrobianos que devem ser testados são: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem e sulfametoxazol. Os resultados dos TS das MCR são obtidos entre três e quatro dias e os valores de CIM, bem como a interpretação dos resultados, são baseados em tabelas de ponto de corte propostas pelo CLSI.

Apesar do fato do TS em MNT ser uma ferramenta estabelecida, o seu valor clínico ainda não foi suficientemente revelado. A Resistência natural a uma grande variedade de fármacos determina multirresistência, o que é comum nas MNT. Esta multirresistência, por sua vez, é uma explicação provável da eficácia limitada dos atuais regimes terapêuticos para micobacterioses (VAN INGEN et al., 2012a).

As micobactérias são relativamente resistentes a compostos antimicrobianos devido à parede celular impermeável associada à inativação enzimática dos fármacos e ao amplo repertório de bombas de efluxo, que caracterizam o gênero (PRIMM et al., 2004). O desenvolvimento de biofilmes é outra forma importante de resistência a agentes antimicrobianos (TENG & DICK, 2003).

4.8 Biofilmes

Os microrganismos apresentam-se nos ambientes aquosos tanto na forma planctônica como na forma sésil. Na forma planctônica se encontram em suspensão e dispersos no meio aquoso, enquanto que na forma sésil se encontram aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes (MACHADO, 2005). A maioria das bactérias é encontrada no meio ambiente não como células isoladas, mas como biofilmes, comunidades de células sésseis (OJHA & HATFULL, 2007).

Os biofilmes são comunidades biológicas com elevado grau de organização, onde bactérias e outros microrganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. As estruturas apresentam uma distribuição variável de células e agregados celulares, aos quais constituem um modo protegido de crescimento de microrganismos (BONEZ et al., 2013) e influenciam na virulência bacteriana, patogênese e sobrevivência ambiental (ARAI et al., 2013).

Em seus ambientes naturais, as bactérias encontram uma infinidade de adversidades que provocam uma série de respostas adaptativas altamente reguladas. Estas respostas não só protegem as células bacterianas, como também causam impacto na suscetibilidade a agentes antimicrobianos (POOLE, 2012). A formação de biofilmes pode ser uma resposta ao stress oxidativo em hospedeiros mamíferos e no ambiente externo, onde a reação a espécies reativas de oxigênio é fundamental para a sobrevivência das bactérias (GEIER et al., 2008).

A colonização da superfície por formação de biofilmes é uma estratégia universal das bactérias para a sobrevivência e pode ocorrer naturalmente, como no caso das bactérias formadoras da cárie, ou até mesmo em instalações industriais, por exemplo (COVIZZI et al., 2007).

As vantagens de uma célula bacteriana em se encontrar inserida em um biofilme são numerosas, principalmente na proteção contra agentes agressivos. Os microrganismos presentes em biofilmes têm notavelmente alta resistência a antimicrobianos, desinfetantes e ao sistema imunitário dos hospedeiros (ARAI et al., 2013). Além disso, entre os benefícios para os microrganismos que o compõe, encontra-se o aumento da concentração de nutrientes na interface biofilme-líquido, possibilidade de troca de material genético e utilização de substratos de difícil degradação devido ao estabelecimento de relações de simbiose (MITTELMAN, 1998). Os biofilmes demonstram, também, resistência acrescida à radiação UV, alterações de pH, desidratação e a predadores como protozoários (XAVIER et al., 2005).

4.9 Estrutura e composição dos biofilmes

Os biofilmes permitem a coexistência de diferentes microrganismos em sua estrutura, sejam ou não de mesma espécie (OLIVEIRA, 2011). A composição do biofilme é dependente das condições do meio em que biofilme está inserido, sendo influenciado pela temperatura, pressão, pH e oxigênio dissolvido. Além disso, o biofilme pode englobar partículas sólidas, como areia e partículas orgânicas provenientes do meio aquoso onde está imerso. As comunidades biológicas sésseis encontram-se envolvidas em matrizes poliméricas produzidas por elas próprias, o que favorece relações simbióticas e permite a sobrevivência de microrganismos em ambientes hostis (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

Um biofilme é considerado uma estrutura muito adsorvente e porosa devido a ser constituído essencialmente por água (cerca de 80 a 95%). Os microrganismos representam somente uma parte da massa de biofilme que, frequentemente, é menor que 10%. É composto por um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros - conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS). As EPS, ou matriz exopolissacarídica, formam um esqueleto para a arquitetura tridimensional do biofilme, sendo responsáveis pela adesão a superfícies e a coesão no biofilme. Este emaranhado polimérico envolve todas as células microbianas (OLIVEIRA, 2011; FLEMMING & WINGENDER, 2010).

A composição química das EPS é muito heterogênea e complexa, no entanto, de uma maneira geral, são os polissacarídeos que predominam. A matriz polimérica pode ser constituída por proteínas, água, ácidos nucleicos, glicoproteínas, íons, fosfolípidos, entre outros componentes. De acordo com alguns autores esta matriz tem o potencial de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes (OLIVEIRA, 2011).

A matriz polimérica é produzida pelos próprios microrganismos ao qual o biofilme está incorporado e é responsável pela morfologia, estrutura, coesão, integridade funcional dos biofilmes e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (MACHADO, 2005). Na tabela 2, podem-se observar algumas das funções desempenhadas pelas EPS no biofilme bacteriano.

Os biofilmes de micobactérias contêm uma matriz extracelular rica em ácidos micólicos livres, que abriga as populações de bactérias, conferindo uma maior resistência do biofilme aos fármacos nocivos às micobactérias, apesar da exposição a altos níveis de antimicrobianos (OJHA et al., 2008).

Tabela 2: Funções de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) no biofilme bacteriano. Adaptado de Flemming & Wingender (2010).

Função	Relevância para os biofilmes
Adesão	Permite os passos iniciais da colonização de superfícies pelas células planctônicas, e a fixação dos biofilmes as superfícies.
Agregação de células bacterianas	Permite comunicação entre as células, a imobilização temporária de populações bacterianas, o desenvolvimento de densidades celulares elevadas e reconhecimento de célula a célula.
Coesão dos biofilmes	Forma uma rede de polímero, mediando a estabilidade mecânica do biofilme e, através da estrutura das EPS, determina a arquitetura do biofilme e permite a comunicação célula a célula.
Retenção de água	Mantém um microambiente altamente hidratado em torno dos microrganismos do biofilme, levando à tolerância a dessecação em ambientes deficientes em água.
Barreira protetora	Confere resistência às defesas do hospedeiro durante infecções, e confere tolerância a vários agentes antimicrobianos, como desinfetantes e antimicrobianos.
Atividade enzimática	Permite a digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutriente e a degradação de EPS estruturais, permitindo a liberação de células dos biofilmes.
Fonte de nutrientes	Fornece suprimento de carbono, nitrogênio e fósforo para utilização pelo biofilme.
Troca de informação genética	Facilita a transferência horizontal de genes entre as células do biofilme.
Exportação de componentes celulares	Libera material celular como resultado da atividade metabólica.

Adaptado de Flemming & Wingender (2010).

4.10 Processos envolvidos na formação de biofilmes

Os biofilmes podem formar-se nas mais diversas superfícies, nos quais se incluem os tecidos vivos, equipamentos hospitalares, nos sistemas de água potável ou industrial, ou ainda em sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002). No caso das micobactérias, também podem formar-se em interfaces ar-líquido (OJHA & HATFULL, 2007).

O biofilme segue um ciclo biológico que inclui o processo de iniciação, maturação, manutenção e desprendimento. O processo da formação do biofilme depende do tipo de microrganismo, da composição da superfície e das influências do meio ambiente. A presença

de uma espécie de microrganismo sobre a superfície poderá promover a adesão de outra espécie (DUNE, 2002).

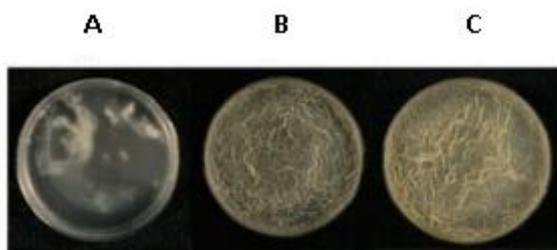


Figura 4: Biofilme de *Mycobacterium smegmatis* cultivado em meio de cultura M63. Formação de biofilme em superfície ar-líquido com (a) 3 dias (b) 4 dias e (c) 5 dias de cultivo. Adaptado de Ojha & Hatfull, 2007.

A formação e acumulação de biofilmes é resultado de vários processos de natureza física e biológica: transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente adesão; crescimento e divisão de células aderidas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS; fixação de células bacterianas flutuantes (e outras partículas), contribuindo para a acumulação do biofilme; libertação de material celular segundo dois mecanismos: (a) erosão (perda de células individuais) ou (b) perda de agregados maiores (XAVIER et al., 2005).

O processo de formação do biofilme tem início com bactérias circulantes, que ao entrarem em contato com uma superfície iniciam o processo de adesão, formando pontes de ligação entre si e a superfície. À medida que a população bacteriana aumenta, os microrganismos se organizam em microcolônias, dispostas em monocamadas. Durante as etapas de contato, adesão e formação de microcolônias, cada bactéria passa a produzir moléculas sinalizadoras que desencadeiam a ativação de genes específicos alterando do fenótipo de bactérias planctônicas para o fenótipo de biofilme. Esse processo de intensa comunicação celular mediado por moléculas sinalizadoras é conhecido como *quorum sensing* (TUTTLEBEE et al., 2002; TATEDA et al., 2007). O *quorum sensing* é um fator relevante na formação do biofilme e é dependente da densidade da população no biofilme (BHARATI & CHATTERJI, 2013).

A ativação de genes envolvidos com o fenótipo do biofilme leva a produção de matriz extracelular, crescimento e agrupamento tridimensional das bactérias, aumento da aderência com a superfície e a formação de canais de água para a troca de água e nutrientes com o meio externo. Uma vez formado, o biofilme pode permanecer aderido à superfície por longo

período ou se desprender, servindo como uma fonte perpetuadora do ciclo ao liberar formas planctônicas e agregados celulares para colonização de novos sítios (RICKARD et al., 2003).

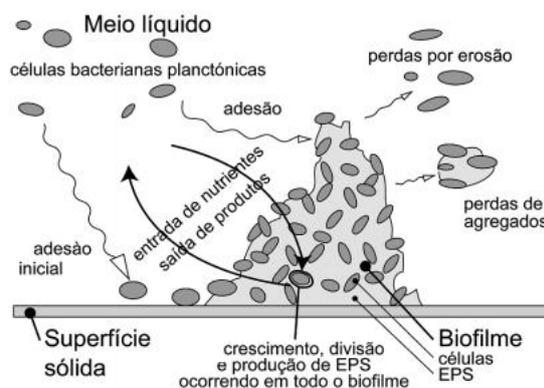


Figura 5: Processos envolvidos na formação de biofilmes. Adaptado de Xavier et al. (2005).

A capacidade de algumas bactérias de colonizar a interface ar-líquido se deve ao nicho favorável criado, onde nutrientes e oxigênio são gradientes, opondo-se. Nesta interface, os microrganismos encontram acesso ao oxigênio abundante do ar acima e nutrientes em solução abaixo. A colonização da interface ar-líquido forma um biofilme flutuante com a fixação a superfícies sólidas (KOZA et al., 2009).

Alguns estudos genéticos forneceram uma visão sobre alguns dos principais fatores necessários para formação do biofilme de micobactérias. Os glicopeptídeos (GPL) são necessários para a fixação inicial na superfície das células bacterianas (NGUYEN et al., 2010). Os GPL são peptídeos lipídios glicosilados presentes na camada exterior do envelope celular das micobactérias e estão intimamente ligados a motilidade das micobactérias já que estas não possuem flagelos para a movimentação celular (RECHT et al., 2000).

Outro fator preponderante no processo de formação do biofilme em micobactérias pode ser citado na etapa de maturação do biofilme, onde é necessário que o CO₂ produzido pelas bactérias não se acumule e o oxigênio esteja em abundância. Além disso, nas fases finais de maturação de biofilmes de micobactérias, o nível de ácidos micólicos também está intimamente relacionado com o processo (OJHA et al., 2008).

4.11 Resistência associada à presença de biofilmes

A formação de biofilme é uma estratégia altamente eficaz para o patógeno proliferar como uma comunidade tolerante a situações de estresse em nichos protegidos e com invasão limitada do sistema imunitário. Assim, as infecções que apresentam como causa um biofilme podem constituir diagnósticos significativos e desafios terapêuticos em contextos clínicos (ISLAM et al., 2012).

Em um biofilme, as bactérias podem ser até 1000 vezes mais resistente a um agente antimicrobiano quando comparadas às mesmas células planctônicas. Já se propôs que o mecanismo de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos inclui a baixa taxa de crescimento populacional, a produção de matriz polimérica - que pode formar uma barreira aos antimicrobianos - e os padrões únicos de expressão de genes (SCHINABECK & GHANNOUM, 2003).

No que diz respeito ao crescimento e à capacidade para resistir aos agentes biocidas, os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento diferente dos microrganismos na forma planctônica. Os mecanismos responsáveis pela resistência aos agentes antimicrobianos das bactérias dos biofilmes podem estar relacionados com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (DONLAN & COSTERTON, 2002).

As estruturas altamente hidratadas dos biofilmes contêm canais que permitem a difusão interna de nutrientes e oxigênio e também conferem proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e a entrada de antimicrobianos, dificultando a difusão do fármaco nos tecidos (DONLAN, 2002). Além disso, a formação de biofilmes pode ser uma alternativa ao esgotamento de nutrientes ou ao acúmulo de resíduos de produtos agressivos (STEWART & COSTERTON, 2001).

Existem evidências de que diferentes espécies possam se associar nos biofilmes e provocar uma maior resistência a antimicrobianos, como, por exemplo, a associação de uma espécie capaz de degradar ou inativar um tipo de antimicrobiano que é eficiente contra outra espécie que compõe o biofilme. As populações sésseis se proliferam mais lentamente do que as formas planctônicas, prejudicando, portanto, sua resposta a muitos antimicrobianos que agem essencialmente quando as células se dividem. No biofilme, os microrganismos estão mais protegidos da ação dos antimicrobianos, que encontram dificuldades em transpor a barreira polimérica e ter acesso aos nichos onde as bactérias estão. Em relação à resposta do

hospedeiro, as células de defesa como os neutrófilos têm maior dificuldade de entrar na matriz dos biofilmes para fagocitá-las (PASTERNAK, 2009).

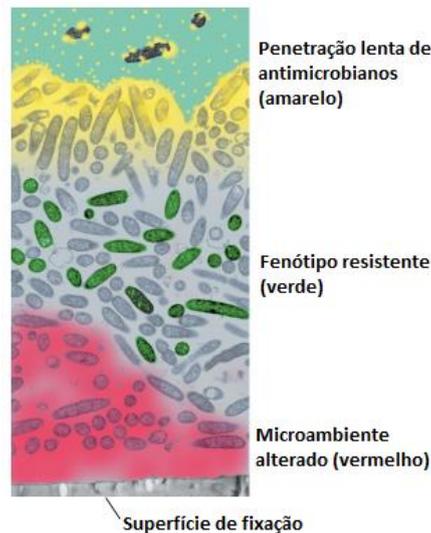


Figura 6: Mecanismos de resistência a antimicrobianos em biofilmes. A superfície de ligação é mostrada na parte inferior e, no topo, a fase aquosa contendo o antimicrobiano. Em amarelo, é demonstrado que o antimicrobiano pode fracassar na penetração para além das camadas superficiais do biofilme. Em verde, a representação de que algumas bactérias podem diferenciar-se em um estado fenotípico protegido. Na zona vermelha, é mostrado um microambiente alterado, no qual pode ocorrer esgotamento de nutrientes ou acumulação de resíduos e, assim, a ação antibiótica poderá ser antagonizada. Adaptado de Stewart & Costerton (2001).

As principais características de biofilmes *in vivo* são bactérias agregadas, que toleram a defesa do hospedeiro e concentrações elevadas de agentes antimicrobianos (BJARNSHOLT, et al., 2013). Mesmo em indivíduos que possuem o sistema imune competente, infecções que apresentam biofilmes como a base são raramente resolvidas apenas com intervenção medicamentosa. Os tecidos adjacentes ao biofilme podem sofrer danos colaterais por complexos imunes e pela atividade de neutrófilos. Testes de suscetibilidade em modelos de biofilme *in vitro* demonstraram a sobrevivência das bactérias de biofilmes após o tratamento com antimicrobianos em concentrações centenas ou mesmo milhares de vezes maiores que a CIM apresentada por antimicrobianos testados em populações planctônicas (STEWART & COSTERTON, 2001).

In vivo, os antimicrobianos podem suprimir sintomas de infecção por erradicar as bactérias de livre flutuação, que são liberadas pela população séssil, mas não conseguem erradicar as células bacterianas ainda incorporadas aos biofilmes. No momento em que se suspende a quimioterapia antimicrobiana, o biofilme pode agir como um nicho para a

recorrência da infecção. As infecções causadas por biofilmes geralmente persistem até que a superfície colonizada é cirurgicamente removida do corpo (STEWART & COSTERTON, 2001).

A formação de biofilmes usualmente está associada a infecções persistentes. A dificuldade de implementação de uma estratégia terapêutica adequada para essas infecções, onde a fonte de infecção é a formação de biofilmes, está diretamente relacionada à estrutura compacta dos mesmos, onde substâncias tóxicas às células microbianas, como por exemplo, os antimicrobianos e antissépticos, enfrentam dificuldades para penetrar no biofilme (DONLAN & COSTERTON, 2002; VASCONCELLOS, 2009).

4.12 Biofilmes formados por micobactérias

As micobactérias são prevalentes em biofilmes, sendo relativamente resistentes a agentes como glutaraldeído e formaldeído. A formação de biofilmes sobre superfícies sólidas, em tubulações de sistemas de distribuição de água, piscinas e esgotos favorece às MNT a persistirem no ambiente, apesar de seu crescimento lento. Além disso, em função da parede rica em ácidos micólicos e ácidos graxos, fica dificultada a penetração de desinfetantes na matriz extracelular (SENNA et al., 2008; PITOMBO et al., 2009).

As micobactérias estão presentes em fontes de águas naturais e artificiais, incluindo-se o encanamento de residências domésticas. A hidrofobicidade de MNT permite a aderência das células e posterior formação de biofilmes nas superfícies dos sistemas de distribuição de água (MULLIS & FALKINHAM, 2013). A presença de micobactérias ambientais em biofilmes pode causar impactos na saúde humana e podem ser responsáveis por infecções e surtos de doenças, devido a problemas de contaminação (SENNA et al., 2008). A liberação desses microrganismos dos biofilmes pode servir como um mecanismo para a disseminação de novas infecções, representando um risco significativo para a saúde (MULLIS & FALKINHAM, 2013).

A detecção de micobactérias em biofilmes oriundos de diferentes sistemas hídricos tem sido relatada, embora a identificação das espécies não tenha sido alcançada em todos os casos. Espécies de crescimento rápido, como *M. fortuitum* e *M. chelonae*, têm sido descritos

como parte de biofilmes polimicrobianos, onde MCL também foram isoladas (ESTEBAN et al., 2008).

Infecções causadas por micobactérias são notoriamente problemáticas na implementação de um tratamento com antimicrobianos eficaz e o envolvimento do papel dos biofilmes na tolerância aos fármacos deve ser considerado (OJHA & HATFULL, 2007; TENG & DICK, 2003). Diferentes estudos *in vitro* comprovam a resistência de biofilmes formados por MCR contra desinfetantes e antimicrobianos, incluindo resistência a amicacina e claritromicina (PÉREZ, 2011).

Células de *M. avium* cultivadas em superfícies de cateteres são significativamente mais resistentes aos antimicrobianos do que as células cultivadas em suspensão. Neste trabalho, o autor enfatizou que as concentrações de antimicrobianos, com base nos resultados da suscetibilidade de células cultivadas em suspensão, podem ser muito baixas para matar ou inibir o crescimento de micobactérias dispostas em biofilme. Como conclusão, ressaltou-se a necessidade de se desenvolver métodos para avaliar CIM de micobactérias que crescem em biofilmes (FALKINHAM, 2007).

Entre MCR, alguns estudos têm demonstrado a resistência a um largo espectro de antimicrobianos que são normalmente utilizados para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos (PÉREZ, 2011). O biofilme de *M. smegmatis* apresentou resistência à isoniazida e supõe-se que as características de permeabilidade e/ou outros mecanismos desconhecidos foram responsáveis por essa resistência (TENG & DICK, 2003). Biofilmes de *M. abscessus* foram também resistentes à cefoxitina, amicacina e claritromicina (GREENDYKE & BYRD, 2008).

5 MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O **manuscrito** está disposto na forma que foi enviada para publicação à revista científica **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.

Antibiofilm Effect of Antimicrobials Used in the Therapy of Mycobacteriosis

Vanessa da Costa Flores^{1#}, Fallon dos Santos Siqueira¹, Caren Rigon Mizdal¹, Pauline Cordenonsi Bonez¹, Vanessa Albertina Agertt¹, Sílvio Terra Stefanello², Tanise Vendruscolo Dalmolin¹, Grazielle Guidolin Rossi¹, Bianca Vendruscolo Bianchini¹, Jaciane Baggiotto Marques¹, Marli Matiko Anraku de Campos¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria.

² Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria.

[#]Address correspondence to Vanessa da Costa Flores, vacflores@hotmail.com.

ABSTRACT

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic pathogens that are naturally present in the environment. When in biofilms, mycobacteria are highly resistant to antibacterial treatments. The understanding of factors related to the failure of treatments such as biofilm formation, contributes to the elucidation of the pathogenic potential and drug resistance presented by these microorganisms. The antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense* was determined in planktonic and sessile populations. The antimicrobials amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem, and sulfamethoxazole were tested. For each drug, it

was evaluated the susceptibility of the pathogen, the ability to inhibit biofilm formation and the resistance of biofilms to antimicrobial activity. Results showed that although the tested antimicrobials are used as an alternative therapy for RGM, *M. abscessus* presented to be resistant to clarithromycin and *M. massiliense* showed a resistant profile to clarithromycin and sulfamethoxazole. Furthermore, the inhibition of biofilm formation and its destruction have not been fully met. The susceptibility profiles found emphasize the need for the determination of drug sensitivity. Considering that the biofilms are a known form of bacterial resistance, the failure of alternatives to inhibit or destroy biofilms can trigger the recurrence of infections. In RGM, besides causing treatment failures, biofilms are a factor of pathogenic risk, since these microorganisms are found in environmental sources and can easily cause infections.

Keywords: Rapidly growing mycobacteria, mycobacteriosis, susceptibility, biofilm.

INTRODUCTION

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are a group of opportunistic bacteria that are found naturally in the environment. Infections caused by these organisms are acquired from environmental resources such as water and soil (1, 2). Among the RGM, we find the species *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium fortuitum*, which cause a wide spectrum of diseases such as lung disease, lymphadenopathy and soft tissue infections (3). Recently, due to the difference of antibiotic resistance phenotypes, the species *M. abscessus* was further subclassified into three new closely related species: *M. abscessus sensu stricto* (ss), and *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* (4).

Mycobacteriosis are diseases caused by nontuberculous mycobacteria, notoriously problematic in the choosing of an effective antimicrobial treatment. Various strains are resistant to many antibiotics, which complicates the treatment of mycobacteriosis (5, 6, 7). The RGM require individualized treatment that must be selected based on the results obtained from *in vitro* susceptibility tests (8). The test can be applied to any RGM with clinical significance and the antimicrobial agents to be tested are: amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem and sulfamethoxazole (9).

Recent studies suggest that the capacity for biofilm development is related to virulence, pathogenicity in humans, resistance to antimicrobial agents and environmental survival (10, 11). Biofilms are biological communities with a high degree of organization, where bacteria and other microorganisms form structured, coordinated and functional

communities. The structures present a variable distribution of cells and cell aggregates, to which they are a protected way for microorganisms growth (12,13). Biofilms can be formed in several different surfaces, which include: living tissue, hospital equipment, drinking or industrial water systems, natural aquatic systems (14) and, in the case of mycobacteria, they can be formed at air-liquid surfaces (8).

Mycobacteria are present in natural and artificial water sources, including domestic residence plumbing. The hydrophobicity of mycobacteria allows adhesion of cells and subsequent formation of biofilms on surfaces of water distribution systems. The release of these microorganisms from existing biofilms can serve as a mechanism for the spread of new infections, representing a significant health risk (15). The common presence of RGM in hospital tap water, the resistance to agents such as glutaraldehyde and chlorine, the capacity to survive and grow in distilled water and ability to form biofilms of these microorganisms are facts that allow this group of mycobacteria to remain a threat in hospital settings (16).

Biofilms formed by RGM can cause impacts on human health and are responsible for infections and disease outbreaks due to contamination problems. The understanding of physiological factors that cause the failure in the treatment of mycobacteriosis, such as biofilm formation, contributes to the elucidation of the pathogenic potential and drug resistance presented by these microorganisms.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and Antimicrobial Agents

The following strains were used for this study: *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. fortuitum* (ATCC 6841) and *M. massiliense* (ATCC 48898). Colonies were isolated on Löwesten-Jensen solid medium (HiMedia Laboratories), and then cultured in Middlebrook 7H9 broth medium (Difco Laboratories) containing 0.2% (vol/vol) glycerol and 10% (vol/vol) OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) (17).

The antibiotics tested include amikacin (Fluka), ciprofloxacin (Fluka), Clarithromycin (Sigma), doxycycline (Sigma), imipenem (Fluka) and sulfamethoxazole (Fluka).

Susceptibility tests

For the completion of susceptibility tests the microdilution method was used according to the standard protocol CLSI M24-A2. The antimicrobial agents were evaluated at the following concentrations: amikacin (1 to 128 µg/ml), ciprofloxacin (0.125 to 16 µg/ml), clarithromycin (0.06 to 64 µg/ml), doxycycline (0.25 to 32 µg/ml), imipenem (1 to 64 µg/mL) and sulfamethoxazole (1 to 128 µg/ml). The inoculum was standardized according to the McFarland 0.5 scale. For the preparation of the final inoculum (5×10^5 UFC/mL) it was transferred the amount of 50 µL from the bacterial suspension to a tube containing 10 mL of Mueller-Hinton broth (Merck). On sterile titration microplates it was added 100 µL from the antimicrobial dilution and the inoculum in equal volume. After incubation for 72 hours at 30°C, it was done the readings of the plates and it was determined the minimum inhibitory concentrations (MIC). The breakpoints for the interpretation of susceptibility of microorganisms to antimicrobial agents can be seen in Table 1 (9).

Biofilm formation inhibition test

The antimicrobial agents were tested individually for their ability to inhibit biofilm formation of a mycobacterial species. The concentrations of the antibiotics used were equal and lower than the MICs. The biofilm formation was adapted to macro-technique from the work described by Carter et al. (2003), maintaining the proportions of medium, antibacterial and inoculum. In polystyrene test tubes with a 5 mL capacity were added 1 mL of Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 UFC/mL of each bacterial species to be tested and 1 mL of the dilution of the antimicrobial to be evaluated. The tubes were covered with parafilm® and incubated at 30°C for 7 days (18).

Biofilm destruction test

Using the adapted technique of Carter et al. (2003), in polystyrene test tubes were added 1 mL of Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 UFC/mL of the bacterial species, which were covered with parafilm ® and incubated at 30°C for 7 days (18). After biofilm formation, 1 mL of antimicrobial was added to each tube in concentrations equal or higher

than the MICs. The tube was covered with parafilm® and it was incubated at 30°C for 24 more hours.

Quantification of biofilms

The biofilm was quantified as described by Bonez, et al. (2013), adapted to macro-technique. The cells that were weakly adhered to the biofilm were removed by the rinsing with saline and the remainder was dried at room temperature for a few minutes. After this, it was added 2 mL of a suspension of 0.1% crystal violet, and the tubes were kept at rest for 10 minutes to further rinsing with saline to remove remaining planktonic cells and the excess dye. 2 mL of 95% ethanol were added to each test tube, kept for 15 minutes, and transferred to disposable cuvettes for a later reading in optical density (OD) of 570nm (12). The biofilm formation was determined by the significant difference between the averages of absorbance obtained in the positive control (culture medium and bacteria) and the average obtained by the negative control (culture medium only). The experiment was performed in triplicate.

Statistical Analysis

The optical density readings obtained in the tests of biofilm formation were expressed as mean \pm standard deviation. We used one-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test, considering statistical difference at $p < 0.05$. For the realization of graphs, the GraphPad Prism version 5.01 software was used.

RESULTS

The minimum inhibitory concentrations (MIC) conducted by the method of broth microdilution with the ones of the antimicrobial agents are shown in Table 2.

In the biofilm formation inhibition tests, there was no significant difference between the negative control and the antibiotics used in their respective MICs.

Amikacin, in concentrations lower than its respective MIC, was capable of reducing biofilm production of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* in various tested concentrations. In the test of biofilm destruction, the effectiveness was not satisfactory and the

antimicrobial agent was able to present a small anti-biofilm effect only for *M. massiliense* biofilm at the concentration of 64µg/mL(Figure 1).

Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin resulted in decreased production of the biofilms of *M. abscessus* and *M. massiliense* at different tested concentrations. In addition, ciprofloxacin showed little destructive action on biofilms formed by *M. massiliense* at concentrations of 2, 4 and 8 µg/mL (Figure 2).

Clarithromycin caused reduction in production and slight destruction of biofilms of *M. abscessus* and *M. massiliense* at different concentrations, ranging from 2 to 16 µg/mL in the inhibition test and from 16 to 1024 µg/mL in the biofilm destruction test. In action against *M. fortuitum* biofilms, clarithromycin showed no difference between microbial growth in the positive control and the growth obtained at the tested concentrations (Figure 3).

Doxycycline attenuated biofilm production of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*. When applied on formed biofilms of the same microorganisms, doxycycline at concentrations of 2 and 4 µg/mL was able to discreetly destroy the films formed by *M. abscessus* and at the concentration of 32µg/mL the biofilm from *M. massiliense* (Figure 4).

In concentrations lower than the MIC, imipenem showed a slight ability to decrease the production of biofilms of *M. fortuitum* and *M. massiliense*. On the trial to evaluate the antibiofilm activity, imipenem only showed significant difference compared to the positive control for the biofilm of *M. massiliense* when used at the concentration of 64µg/mL (Figure 5).

The sulfamethoxazole showed an attenuation effect in the production of biofilms by *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense* in various subinhibitory concentrations tested. On the trial to evaluate the destruction of the biofilm, the antibiotic, in concentrations ranging from 32 to 1024 µg/mL, showed antibiofilm activity for *M. fortuitum* (Figure 6).

DISCUSSION

The advantages attributed to the lifestyle of microorganisms in biofilms are numerous, especially in relation to the protection against aggressive agents (11). When in biofilms, bacteria can be up to a thousand times more resistant to an antimicrobial agent if compared to their planktonic cells (19) and their formation is usually associated with persistent infections (20). Infections caused by microorganisms in a biofilm can pose significant diagnostic and serious therapeutic challenges in certain clinical situations (21).

In our study, we evaluated the impact of different antimicrobial agents on the formation and destruction of biofilms from *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. fortuitum* (ATCC 6841) and *M. massiliense* (ATCC 48898). Prior to tests involving biofilm formation it is indispensable to assess the susceptibility presented by the microorganisms. In the susceptibility test, *M. abscessus* and *M. massiliense* showed to be resistant to clarithromycin, similar profiles to those reported by Kim et al. (2010) that can be assigned to the presence of inducible RNA methylases and the mechanism of induced resistance to macrolides encoded by the *erm* gene (41) in *M. abscessus* species (9, 22, 23). *M. massiliense* also showed a resistance profile to sulfamethoxazole, a result also reported by Cardoso et al. (2011) (24). The different susceptibility profiles found in our study reinforce the need for determining the drug sensitivity profiles in order to provide adequate treatment for mycobacteriosis.

The formation of biofilms is the result of several processes of physical and biological nature. These processes involve the transportation of free cells from the liquid medium to a solid surface and their subsequent adhesion, growth and division of cells, production and excretion of extracellular polymeric substances and the fixation of floating bacterial cells and other particles (14, 25). The microorganism ability of producing extracellular polymers interferes with the formation of biofilms, since this process is closely related to the adhesion to surfaces. Likewise, the hydrophobicity of the surface of microorganisms is also a factor that contributes to adhesion and colonization of surfaces, whether they are inert or living. (26).

At the trial in which we tested the ability of antimicrobials to inhibit the formation of biofilms, the test with all the antimicrobials tested facing *M. massiliense* presented inhibitory results at some concentrations. *M. abscessus* decreased its biofilm formation when exposed to amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline and sulfamethoxazole. *M. fortuitum*, in general, was the microorganism that showed higher resistance to the inhibitory action of the applied antimicrobials. Among the agents tested, amikacin has shown greater effectiveness in the weakening of the formation of the films, with the subinhibitory concentration of 1 µg/mL the most effective after the MIC. None of the antimicrobial agents could, in concentrations lower than the MIC, completely prevent the production of the biofilm by the microorganisms. It is suspected that this is due to the fact that the agents tested do not interfere effectively in the essential processes to the formation of bacterial biofilm.

The microorganisms associated in biofilms exhibit a different behavior from microorganisms in planktonic form (20). It has been proposed that the mechanism of resistance of biofilms to antibiotics include the low growth rate of sessile populations and the

production of polymer matrix. The latter provides protection to microorganisms from the action of antibiotics, which find it difficult to transverse the polymer barrier and gain access to niches where the bacteria are found (19, 27).

The test results on which we tested the power of destruction of antimicrobials against RGM biofilms revealed that the use of commonly used agents in drug therapy of mycobacterial infections can be a dubious strategy to eradicate biofilms from this group of bacteria. Among the microorganisms tested, biofilms from *M. fortuitum* proved to present little fragility on the polymer matrix after exposure to antibiotics. For this species, the partial reduction of biofilm was only achieved after the addition of sulfamethoxazole on the film. Biofilms from *M. abscessus* also showed resistance when exposed to antimicrobial agents, and a small decrease in the bacterial biofilm was achieved only by clarithromycin and by doxycycline. Thus, as in the biofilm formation inhibition test, the films from *M. Massiliense* showed to be more susceptible to the action of the tested drugs, and only the use of sulfamethoxazole had no significant difference compared to the positive control.

Although the biofilm decreased in some situations tested, none of the antimicrobials could completely eradicate the bacterial films. It is suggested that this is due to the fact that the biofilm matrix has the potential to prevent physical access of antimicrobial agents, restricting their diffusion into the interior of these biofilms. Furthermore, mycobacterial biofilms contain the extracellular matrix rich in free mycolic acids which provide a greater biofilm resistance to harmful drugs, despite the exposure to high levels of antibiotics (28).

In vivo, the antibiotics can suppress symptoms of infection by eradicating free-floating bacteria, which are released by the sessile population, but they cannot eradicate the bacterial cells still incorporated into biofilms (29). Considering that the biofilms are a known form of bacterial resistance, the failure of alternatives to inhibit or destroy already formed biofilms can trigger the recurrence of infections. In RGM, the development of biofilms, besides causing failures in drug treatments, is an important pathogenic risk factor, since these microorganisms are abundantly found in environmental sources and can easily cause infections due to contamination problems.

REFERENCES

1. **Esther Jr. CR, Hoberman S, Fine J, Allen S, Culbreath K, Rodino K, Kerr A, and Gilligan P.** 2011. Detection of Rapidly Growing Mycobacteria in Routine Cultures of

Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**:421-1425. doi:10.1128/JCM.02379-10.

2. **Cook JL**. 2010. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *British Medical Bulletin*. **96**:45-59. doi:10.1093/bmb/ldq035.

3. **Huang CW, Chen JH, Hu ST, Huang WC, Lee YC, Huang CC, and Shen GH**. 2013. Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **41**:218-223. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.10.021.

4. **Rachid Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, Murray A, and Gicquel B**. 2012. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67**:810-818. doi: 10.1093/jac/dkr578.

5. **Redelman-Sidi G, and Sepkowitz KA**. 2010. Rapidly Growing Mycobacteria Infection in Patients with Cancer. *Immunocompromised Hosts*. **51**:422-434. doi: 10.1086/655140.

6. **Teng R, and Dick T**. 2003. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. *FEMS Microbiology Letters*. **24**:171-174. doi:10.1016/S0378-1097(03)00584-6.

7. **Ojha A, and Hatfull Gf**. 2007. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Molecular Microbiology*. **66**:468-483. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05935.x.

8. **Fernández-Roblas R, Martín-de-Hijas NZ, Fernández-Martínez AI, García-Almeida D, Gadea I, and Esteban J**. 2008. In Vitro Activities of Tigecycline and 10 Other Antimicrobials against Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria Antimicrobial Agents And Chemotherapy. **52**:4184-4186. doi:10.1128/AAC.00695-08.

9. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2011. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes. Approved standard. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, PA.
10. **Muñoz-Egea MC, García-Pedrazuela M, Mahillo I, García MJ, and Esteban J.** 2013. Autofluorescence as a Tool for Structural Analysis of Biofilms Formed by Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **79**:1065–1067. doi:10.1128/AEM.03149-12.
11. **Arai M, Niikawa H, and Kobayashi M.** 2013. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. *Journal of Natural Medicines*. **67**:271-275. doi: 10.1007/s11418-012-0676-5.
12. **Bonez PC, Alves CFS, Dalmolin TV, Agertt VA, Mizdal CR, Flores VC, Marques JB, Santos RCV, and Campos MMA.** 2013. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*. **41**:119-122. doi:10.1016/j.ajic.2013.05.002.
13. **Donlan RM.** 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Healthcare Epidemiology*. **33**:1387-1392. doi:10.1086/322972.
14. **Donlan RM.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8**:881-890. doi:10.3201/eid0809.020063.
15. **Mullis SN, and Falkinham JO III.** 2013. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. *Journal of Applied Microbiology*. **115**:908-914. doi:10.1111/jam.12272.
16. **Leão SC, Viana-Niero C, Matsumoto CK, Lima KVB, Lopes ML, Palaci M, Hadad DJ, Vinhas S, Duarte RS, Lourenço MCS, Kipnis A, Neves ZC, Gabardo BMA, Ribeiro MO, Baethgen L, Assis DB, Madalosso G, Erica Chimara, and Dalcolmo MP.** 2010. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. *Future Microbiology*. **5**:971-980. doi:10.2217/FMB.10.49.

17. **Falkinham JO III.** 2003. Factors Influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Applied And Environmental Microbiology*. **69**:5685-5689. doi: 10.1128/AEM.69.9.5685–5689.2003.
18. **Carter G, Wu M, Drummond DC, and Bermudez LE.** 2003. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology*. **52**:747-752. doi: 10.1099/jmm.0.05224-0.
19. **Schinabeck MK, and Ghannoum MA.** 2003. Catheter-Related Infections - Diagnosis, treatment and Prevention. *Clinical Microbiology Newsletter*. **25**:113-118.
20. **Donlan RM, and Costerton JW.** 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**:167-193. doi:0.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
21. **Islam MS, Richards, JP, and Ojha AK.** 2012. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. **10**:1055-1066. doi:10.1586/eri.12.88.
22. **Kim EH, Kim BJ, Kook Y, Yun YJ, Shin JH, Kim BJ, and Kook YH.** 2010. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiology and Immunology*. **54**:347-353. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00221.x.
23. **Choi GE, Shin SJ, Won CJ, Min KN, Oh T, Hahn MY, Lee K, Lee SH, Daley CL, Kim S, Jeong BH, JeonK, and Koh WJ.** 2012. Macrolide Treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* Infection and Inducible Resistance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **186**:917-925. doi: 10.1164/rccm.201111-2005OC.

24. **Cardoso AM, Junqueira-Kipnis AP, and Kipnis A.** 2011. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Mycobacterium massiliense* Recovered from Wound Samples of Patients Submitted to Arthroscopic and Laparoscopic Surgeries. **2011**. doi: 10.1155/2011/724635.
25. **Flemming HC, and Wingender J.** 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. **8**:623-633. doi:10.1038/nrmicro2415.
26. **Kouidhi B, Zmantar T, and Bakhrouf A.** 2010. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. Anaerobe. **16**:566-571. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.09.005.
27. **PASTERNAK, J.** 2009. Biofilmes: um inimigo (in) visível. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. **39**:36-39.
28. **Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, Alahari A, Kremer L, Jacobs WR Jr., and Hatfull GF.** 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. Molecular Microbiology. **69**:164–174. doi:10.1111/j.13652958.2008.06274.x.
29. **STTEWART PS, and COSTERTON JW.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. **358**:135-138.

FIGURES

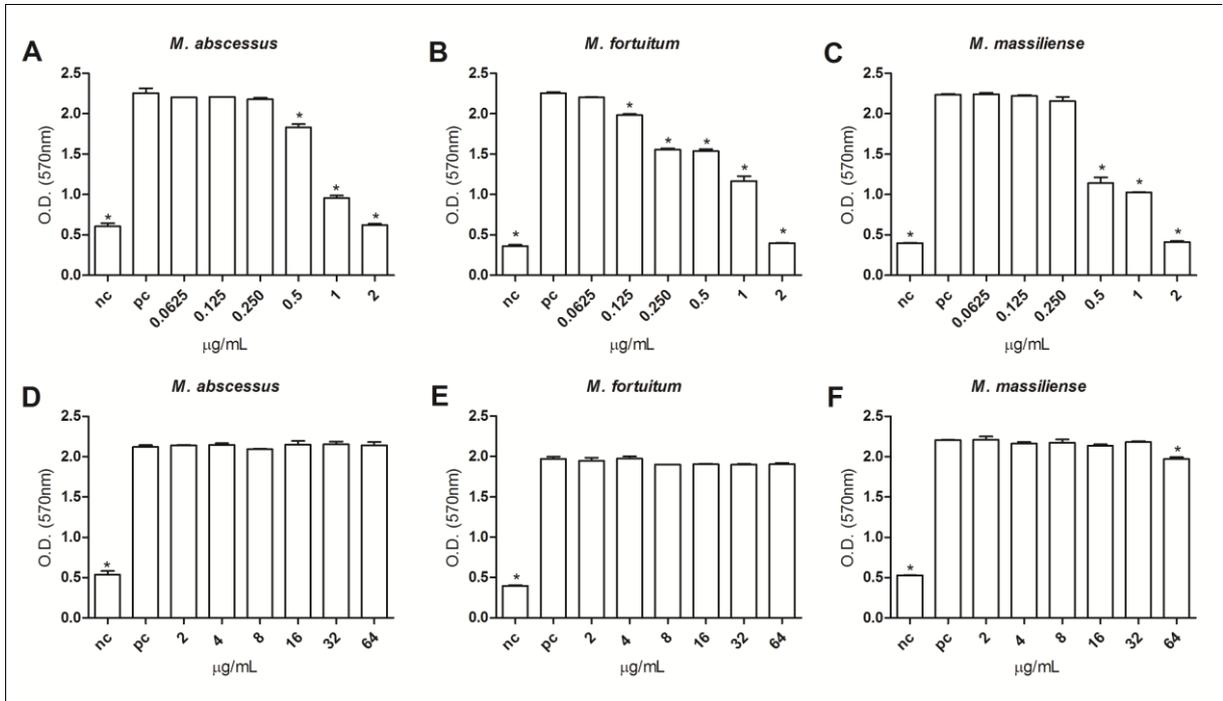


Figure 1: Effect of different concentrations of amikacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents a significant difference when compared to the positive control group (PC) by means of variance analysis (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (n = 3).

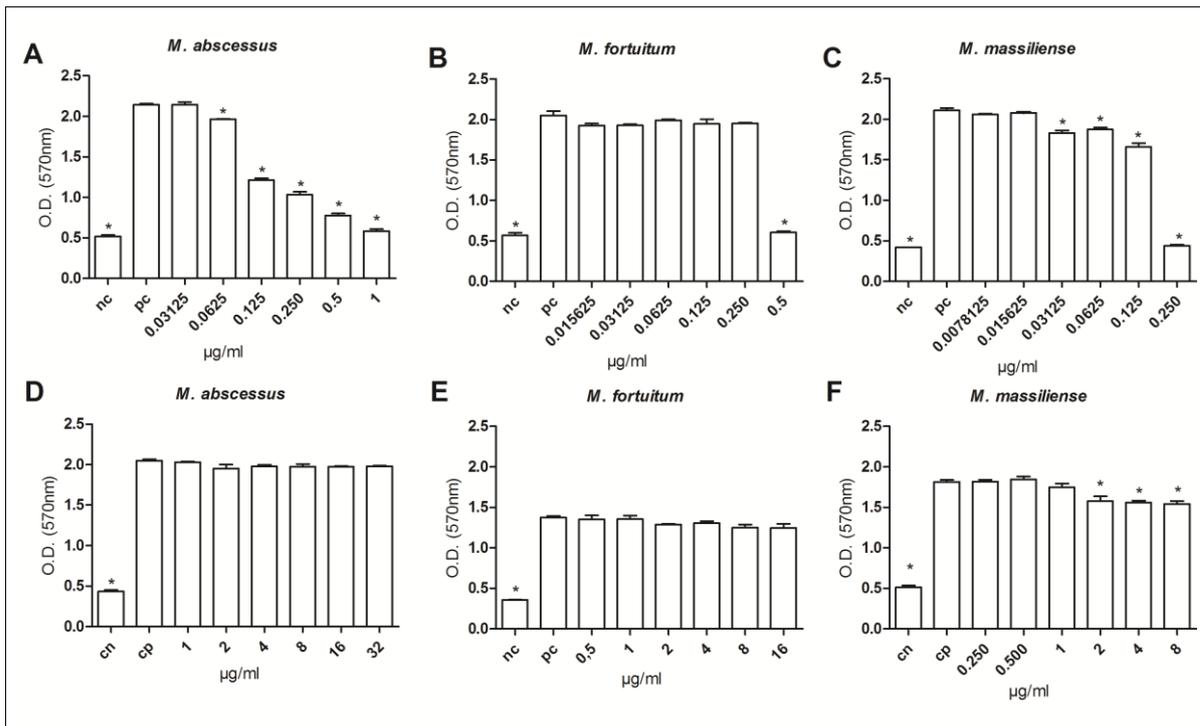


Figure 2: Effect of different concentrations of ciprofloxacin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents a significant difference when compared to the positive control group (PC) by means of variance analysis (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (n = 3).

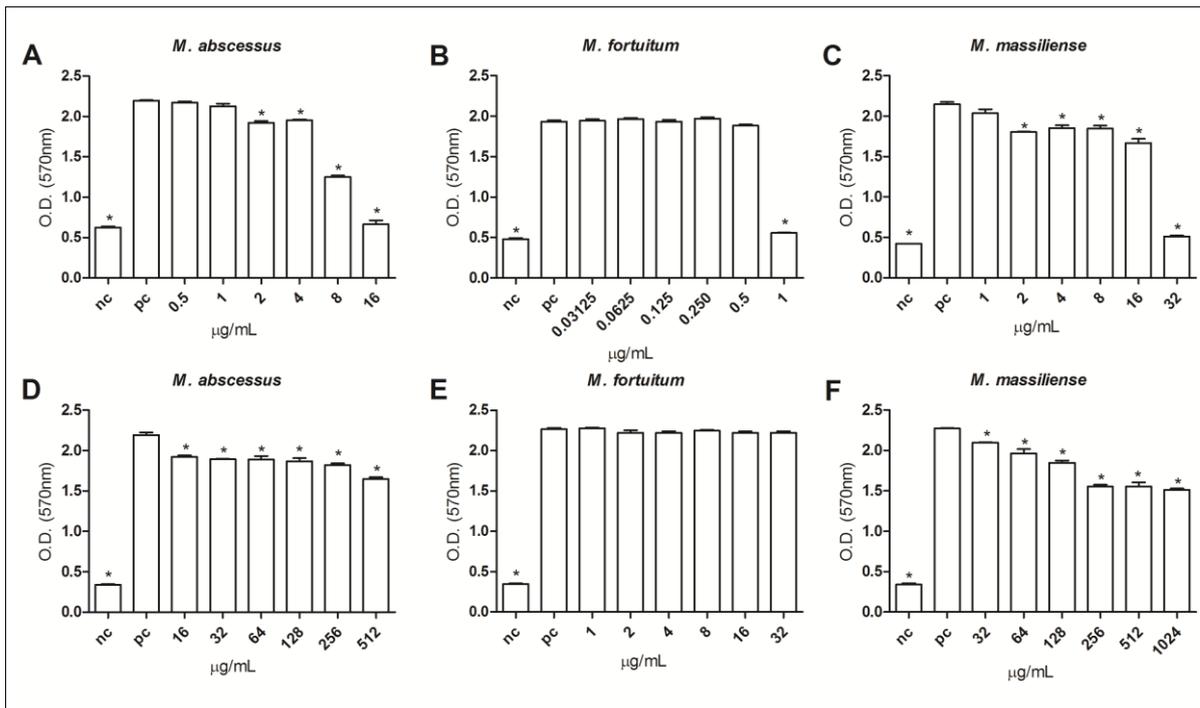


Figure 3: Effect of different concentrations of clarithromycin on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents a significant difference when compared to the positive control group (PC) by means of variance analysis (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (n = 3).

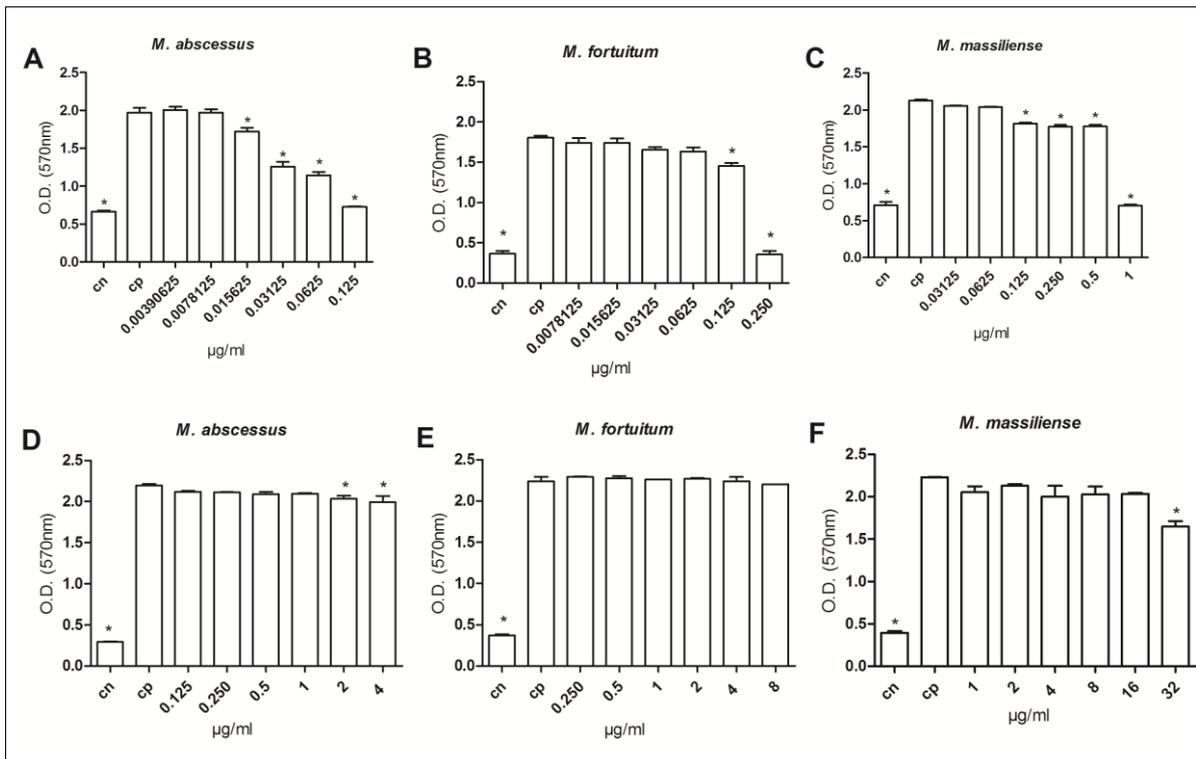


Figure 4: Effect of different concentrations of doxycycline on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents a significant difference when compared to the positive control group (PC) by means of variance analysis (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (n = 3).

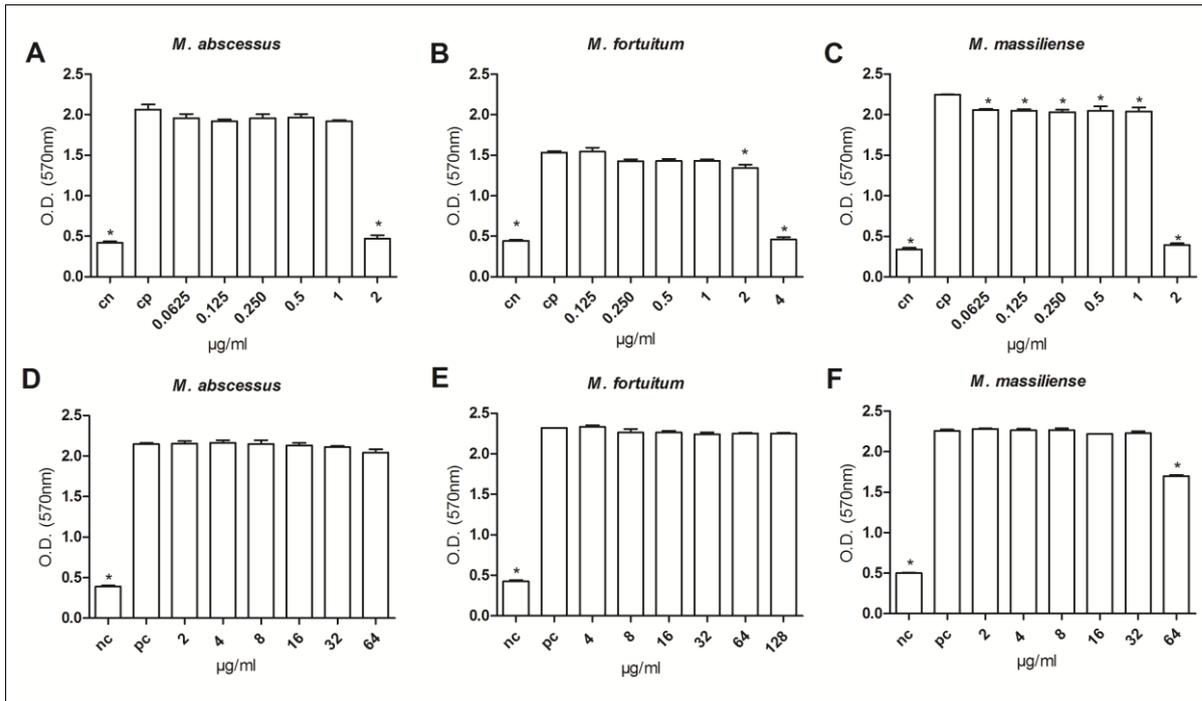


Figure 5: Effect of different concentrations of imipenem on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents a significant difference when compared to the positive control group (PC) by means of variance analysis (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (n = 3).

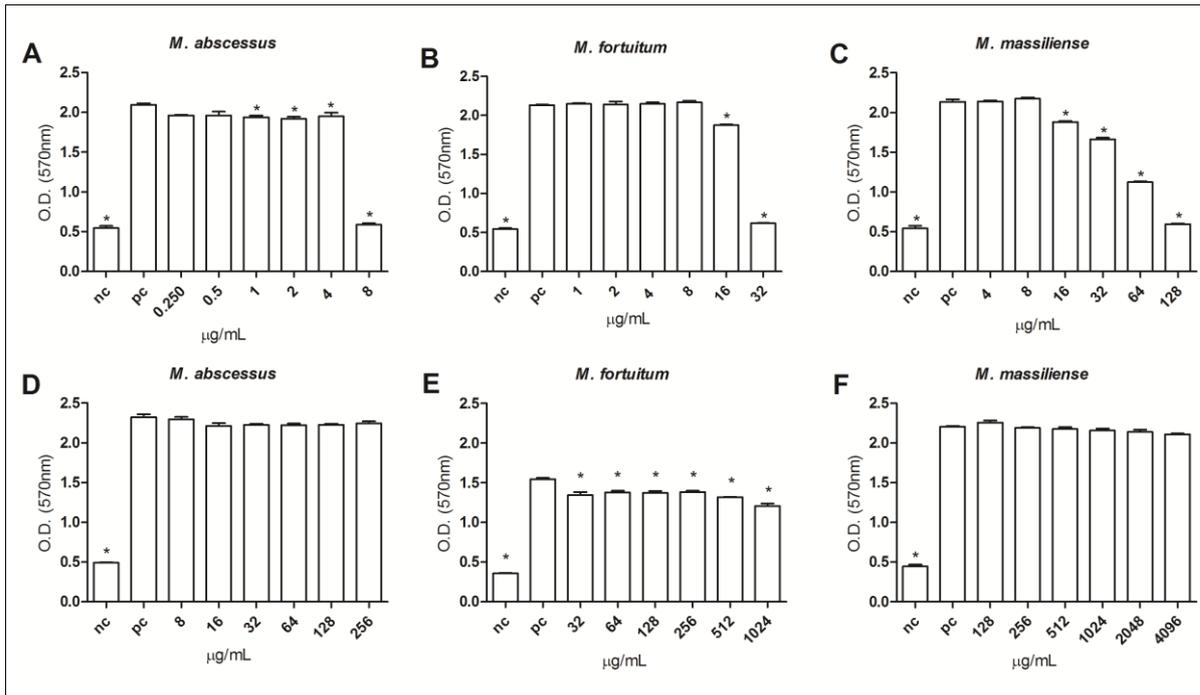


Figure 6: Effect of different concentrations of sulfamethoxazole on the inhibition (A, B and C) and destruction (D, E and F) of the biofilm from *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium massiliense*. * Represents a significant difference when compared to the positive control group (PC) by means of variance analysis (one-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (n = 3).

TABLES

Table 1: Breakpoints for the rapidly growing mycobacteria.

Antimicrobial Agent	Minimal Inhibitory Concentrations ($\mu\text{g/mL}$), by category		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Amikacin	≤ 16	32	≥ 64
Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Clarithromycin	≤ 2	4	≥ 8
Doxycycline	≤ 1	2-4	≥ 8
Imipenem	≤ 4	8-16	≥ 32
Sulfamethoxazole	≤ 38	-	≥ 76

Table 2 Standard susceptibility *in vitro* of *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. massiliense*

Antimicrobial agent	Minimal Inhibitory Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. massiliense</i>
Amikacin	2	2	2
Ciprofloxacin	1	0.500	0.250
Clarithromycin	16 *	1	32 *
Doxycycline	0.125	0.250	1
Imipenem	2	4	2
Sulfamethoxazole	8	32	128 *

* Resistance index.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos objetivos e resultados apresentados nesta dissertação, pode-se considerar que:

- Através da técnica de microdiluição em caldo, *M. massiliense* demonstrou-se resistente à claritromicina e ao sulfametoxazol, e *M. abscessus* exibiu perfil resistente à claritromicina. Os resultados evidenciam a necessidade da avaliação da suscetibilidade de MCR, tendo-se em vista que diferentes espécies podem apresentar diferentes perfis de sensibilidade aos fármacos.
- No ensaio em que foi testada a habilidade dos antimicrobianos de inibir a formação de biofilmes, a amicacina demonstrou maior efetividade no enfraquecimento da formação das películas de MCR, quando comparada a ação dos outros agentes antimicrobianos.
- Embora a diminuição da produção de biofilme tenha sido alcançada em algumas concentrações subinibitórias dos agentes antimicrobianos, nenhum dos antimicrobianos conseguiu inibir totalmente a produção de biofilmes pelos microrganismos.
- Os antimicrobianos não erradicaram totalmente os filmes bacterianos de MCR, e podem ser uma estratégia duvidosa para erradicar biofilmes desse grupo de bactérias.
- *M. fortuitum* foi o microrganismo que mais apresentou resistência a ação inibitória dos antimicrobianos aplicados. Além disso, os biofilmes apresentaram pouca fragilidade da matriz polimérica frente à exposição de antimicrobianos e a sua destruição, mesmo que parcial, só foi alcançada com o uso de sulfametoxazol.
- Nos ensaios de avaliação de inibição do biofilme e de efeito antibiofilme dos agentes antimicrobianos, *M. massiliense* apresentou maior sensibilidade aos antimicrobianos quando comparada com os demais microrganismos.

REFERÊNCIAS

AGERTT, V.A.; et al. Identification of mycobacteria isolated at University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.49, n.2, p.115-117, 2013.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 156, 1997.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. **Breathing in America: Diseases, Progress, and Hope**. Chapter 12, Nontuberculous Mycobacterial Disease. p.121-129, 2010.

ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. **Trends in Analytical Chemistry**. v.26, n.6, p.534-556, 2007.

ANVISA. Bulário Eletrônico. Cloridrato de Ciprofloxacino EMS SIGMA PHARMA LTDA. 2013a. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9115802013&pIdAnexo=1844097. Acesso em: 18 fev 2014.

ANVISA. Bulário Eletrônico. Cloridrato De Doxiciclina EMS S/A. 2013b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5907632013&pIdAnexo=1707177. Acesso em: 18 fev 2014.

ANVISA. Bulário Eletrônico. Imipenem + Cilastatina sódica Rambaxy Farmacêutica Ltda. 2013c. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7570562013&pIdAnexo=1780382. Acesso em: 17 fev 2014.

ARAI, M.; NIKAWA, H.; KOBAYASHI, M. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. **Journal of Natural Medicines**. v.67, p.271-275, 2013.

ARBEX, M.A.; et al. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: Second line drugs. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.36, n.5, p.641-656, 2010.

BACTERIA IN PHOTOS. Disponível em: <http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium%20fortuitum.html>. Acesso em: 24 fev 2014.

BHARATI, B.K.; CHATTERJI, D. Quorum sensing and pathogenesis: role of small signalling molecules in bacterial persistence. **Current Science**. v.105, n.5, 2013.

BJARNSHOLT, T.; et al. The in vivo biofilm. **Trends in Microbiology**. v.21, n.2, 2013.

BLAND, C.S.; et al. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.10, oct, 2005.

BONEZ, P.C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**. v.41, p.119-122, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**. Módulo VI, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica Conjunta N° 01/2009- SVS/MS e ANVISA**. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica Conjunta N° 01/2007- Divisão de Vigilância Sanitária e Divisão de Vigilância Epidemiológica**. Prevenção e controle de infecções por micobactéria não tuberculosa relacionadas a vídeo-cirurgia e outros procedimentos invasivos, 2007.

BROWN-ELLIOT, WALLACE JR, E.J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.4, p.716-746, 2002.

CARDOSO, A.M. 2009. **Surto de Infecção após videoscopias causado por Mycobacterium massiliense em Goiânia: Análise molecular e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

CARDOSO, C.M. 2012. **Avaliação de técnicas moleculares para identificação de micobactérias não causadoras de tuberculose**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CHEN, J.M.; et al. Roles of Lsr2 in Colony Morphology and Biofilm Formation of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**. v.188, n.2, p.633-641, 2006.

CLSI.Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second edition.**CLSI document M24-A2**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2011.

COSMA, C.L.; SHERMAN, D.R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Reviews of Microbiology**. v. 57, p.641-676, 2003.

COVIZZI, L.G.; et al. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v.28, n.2, p.143-160, 2007.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, n.9, p.881-890, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DUARTE, R.S. et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *M. massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47, n.7, p.2149-2155, 2009.

DUNNE Jr, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, p.155-166, 2002

ESTEBAN, J.; et al. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiology**. v.8, n.184, 2008.

FALKINHAM, J.O. III. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **Journal of Medical Microbiology**. v.56, p.250-254, 2007.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v.8, p.623-633, 2010.

FONSECA, T.L.; et al. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoeense*. **Vittale**. v.20, n.1, p.65-71, 2008.

FONTANA, R.T. The Mycobacterias of Rapid Growth and the hospital infection: a public health problem. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v.61, n.3, p.371-376, 2008.

FORGACS, P.; et al. Tuberculosis and Trimethoprim-Sulfamethoxazole. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v.53, n.11, p.4789-4793, 2009.

FREITAS, A.L.; BARTH, A.L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 6, n.1, p.1-7, 2002.

GALES, A.C.; MENDES, R.E. Comparative antimicrobial activity between meropenem and imipenem/cilastatina: does the clinical laboratory need to test both imipenem and meropenem routinely? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.38, n.1, p.13-20, 2002.

GALIL, K.; et al. Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. **Emerging Infectious Diseases**. v.5, n.5, p.681-687, 1999.

GARCÍA-GALÁN, M.J.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**. v.27, n.11, p.1008-1022, 2008.

GEIER, H.; et al. Autoinducer-2 Triggers the Oxidative Stress Response in *Mycobacterium avium*, Leading to Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, n.6, p.1798-1804, 2008.

GREENDYKE, R.; BYRD, T.F. Differential Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* Variants in Biofilms and Macrophages Compared to That of Planktonic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.6, p.2019-2026, jun, 2008.

GRIFFITH, D.E.; et al. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.175, n.4, p.367-416, 2007.

GRIFFITH, D.E. Nontuberculous mycobacterial lung disease. **Current opinion in Infectious Diseases**. v.23, n.2, p. 185-190, 2010.

HINRICHSEN, S.L. Micobactéria de crescimento rápido – MCR. **Prática Hospitalar**. n.53, p.106-111, 2007.

HUANG, C.W.; et al. Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.41, p.218-223, 2013.

JEONG, Y.J.; et al. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection in Immunocompetent Patients: Comparison of Thin-section CT and Histopathologic Findings. **Radiology**. v.231, p.880-886, 2004.

ISLAM, M.S.; RICHARDS, J.P.; OJHA, A.K. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v.10, n.9, p.1055-1066, 2012.

KANAI, K.Y. 2006. **Detecção e identificação de micobactérias em corpos de água destinados à captação para abastecimento urbano da cidade de São Carlos- SP**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

KANATANI, M.S.; GUGLIELMO, B.J. The new macrolides: Azithromycin and Clarithromycin. **Western Journal of Medicine**. v.160, p.31-37, 1994.

KOH, W.J.; KWON, O.J.; LEE, K.S. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent. **Korean Journal of Radiology**. v.3, p.145-157, 2002.

KOZA, A.; et al. Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Microbiology**. v.155, p.1397-1406, 2009.

KRAKAUER, T.; BUCKLEY, M. Doxycycline Is Anti-Inflammatory and Inhibits Staphylococcal Exotoxin-Induced Cytokines and Chemokines. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v.47, n.11, p.3630-3633, 2003.

LEÃO, S.C.; et al. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. **Future Microbiology**. v.5, n.6, p.971-980, 2010.

LOPES, M.L.; et al. Micobacterioses associadas a procedimentos médicos invasivos em Belém. **Revista Paraense de Medicina**. v.19, n.2, p.87-89, 2005.

MACEDO, J.L.S; MAIEROVITCH, C.; HENRIQUES, C.M.P. Infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido no Brasil. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v.24, n.4, p.544-551, 2009.

MACHADO, S.M.O. 2005. **Avaliação do efeito antimicrobiano dosurfactante cloreto de benzalcónio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade de Minho, Braga, 2005.

MARINHO, A.; et al. Nontuberculous mycobacteria in non-AIDS patients. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. v.14, n.3, p. 323-337, jun., 2008.

MARRAS, T.K.; DALEY, Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacteria. **Clinics in Chest Medicine**. v.23, n.3, p.553-567, 2002.

MARTÍNEZ, A.; TORELLO, S.; KOLTER, R. Sliding Motility in Mycobacteria. **Journal of Bacteriology**. v.181, n.23, p.7331-7338, 1999.

MARTINEZ, S. MCADAMS, H.P.; BATCHU, C.S. The Many Faces of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infection. **American Journal of Roentgenology**. v. 189, n.1, p.177-186, jul., 2007.

MITTELMAN, M.W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. **Journal of Dairy Science**. v.81, p.2760-2764, 1998.

MOTA, S.P.M.S. 2011. **Isolamento e identificação molecular de micobactérias não tuberculosas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

MULLIS, S.N.; FALKINHAM, J.O. III. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. **Journal of Applied Microbiology**. v.115, p.908-914, 2013.

NGUYEN, K.T.; et al. Mycobacterial Biofilms Facilitate Horizontal DNA Transfer between Strains of *Mycobacterium smegmatis*. v.192, n.19, p.5134-5142, 2010.

OBIHARA, C.C.; et al. A Brief Overview of Mycobacterial Diseases in Children. **European Infectious Disease**. v.5, n.2., p.102-111, 2011.

OJHA, A. H. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular Microbiology**. v.69 n.1, p.164–174, 2008.

OJHA, A.; HATFULL, G.F. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. **Molecular Microbiology**. v.66, n.2, p.468-483, 2007.

OLIVEIRA, K.R. 2011. **Análise da formação de biofilmes em cateteres: métodos de identificação e controle**. Monografia (Pós-graduação em Análises Clínicas e Gestão de Laboratório) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2011.

OLIVEIRA, M.S.C.; et al. Análise do método Ogawa-Kudoh e comparação com o método lauril sulfato de sódio-Lowenstein-Jensen para diagnóstico da tuberculose no estado de Rondônia. **Revista Pesquisa & Criação**. v.10, n.2, p.127-137, dez, 2011.

PADOVEZE, M.C.; et al. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **Journal of Hospital Infection**. v. 67, n.2, p.161-167, 2007.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in) visível. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. p.36-39, 2009.

PÉREZ, A.O.; et al. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v.29, n.2, p.79-84, 2011.

PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.31, n.11, p.529-533, 2009.

POOLE, K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, p. 2069-2089, 2012.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O III. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v.17, n.1, p.98-106, 2004.

RACHID, N.R.; et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.87, p.810-818, 2012.

RECHT, J. et al. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**. v.182, n. 15, p 4348–4351, 2000.

RICKARD, A.H.; et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**. v.11, n.2, p.94-100, 2003.

SÃO PAULO. Secretaria Estadual de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Micobacterioses: Recomendações para o diagnóstico e tratamento**. 2005.

SÃO PAULO. Secretaria Estadual de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Casos de Infecção por Micobactéria não tuberculosa de Crescimento Rápido (MCR), notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE, dados acumulados de 2002 a 2010**. 2010.

SCHINABECK, M.K.; GHANNOUM, M.A. Catheter-Related Infections - Diagnosis, treatment and Prevention. **Clinical Microbiology Newsletter**. v.25, n.15, p.113-118, 2003.

SENNA, S.G.; BATTILANA, J.; COSTA, J.C.; 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**.v.46, n.11, p.3822-3825, 2008.

SEXTON, P.; HARRISON, A.C. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. **European Respiratory Journal**. v.31, n.6, 2008.

SHI, T.; FU, T.; XIE, J. Polyphosphate deficiency affects the sliding motility and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. **Current Microbiology**. v. 63, p. 470-476, 2011.
SHINNICK, T.M.; GOOD, R.C. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.13, n.11, p.884-901, 1994.

SILVA, C.F.; UEKI, S.Y.M.; GEIGER, D.C.P.; LEÃO, S.C. *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.43, n.1, 2001.

SILVA, J.M.I. 2013. **Caracterização morfológica de Micobactérias Não Tuberculosas Ambientais por ensaios neutrongráficos**. Tese (Doutorado em Engenharia Nuclear) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

STTEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**. v.358, p.135-138, 2001.

SUEHIRO, R.T. 2008. **Avaliação da virulência de isolados suínos de *Mycobacterium avium* no Brasil caracterizados pelo método de RFLP**. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SUTRE, A.F.M.A. 2010. **Estudo molecular da resistência à rifampicina do complexo *Mycobacterium tuberculosis* numa população da Guiné-Bissau**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

TATEDA, K.; et al. Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolides: a promising strategy or an oriental mystery? **Journal of Infection and Chemotherapy**. v.13, n.6, p.357-367, 2007.

TENG, R.; DICK, T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. **FEMS Microbiology Letters**. v.24, p. 171-174, 2003.

TORTOLI E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**. v.16, p.359-354, 2003.

TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v.48, n.2, p.159-178, 2006.

TUTTLEBEE, C.M.; et al. Effective control of dental chair unit waterline biofilm and marked reduction of bacterial contamination of output water using two peroxide-based disinfectants. **Journal of Hospital Infection**. v.52, n.3, p.192-2005, 2002.

UEKI, S.Y.M.; et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v.41, n.1, p.1-8, 2005.

VAN INGEN, J.; et al. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Drug Resistance Updates**. v.15, p. 149– 161, 2012a.

VAN INGEN, J.; et al. Are phylogenetic position, virulence, drug susceptibility and in vivo response to treatment in mycobacteria interrelated? **Infection, Genetics and Evolution**. v.12, n.4, p.832-837, 2012b.

VASCONCELLOS, M. F. 2009. **Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VICENTE, I.C.S. 2003. **Atividade bactericida de um novo derivado 1,2,4 oxadiazol-hidrazida frente ao *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis*.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

WILDNER, L.M. 2012. **Isolamento e Identificação de Micobactérias Não-Tuberculosas em Laboratório e Hospital de Referência do Estado de Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

WILDNER, L.M.; et al. Micobactérias: Epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical.** v.40, n.3, p.207-229, jul.-set., 2011.

XAVIER, J.B.; et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia.** 2005.

ZAMARIOLI, L.A.; et al. Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia.** v.34, n.8, p.590-594, 2008.

ZHANG, Y. Themagic Bullets And Tuberculosis Drug Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology.** v.45, 2005.

ANEXO A - Comprovante de submissão do manuscrito para publicação na revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Dear Dr. Flores,

On March 20, 2014, we received the manuscript "Antibiofilm Effect of Antimicrobials Used in the Therapy of Mycobacteriosis" by Vanessa Flores, Fallon Siqueira, Caren Mizdal, Pauline Bonez, Vanessa Agertt, Sílvio Stefanello, Tanise Dalmolin, Grazielle Rossi, Bianca Bianchini, Jaciane Marques, and Marli Matiko de Campos. The submission form indicates that this paper should be processed as a(n) Full-Length Text intended for publication in the section Susceptibility.

The manuscript has been assigned the control number AAC02848-14. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor.

You can check the status of this manuscript by clicking on the link below and selecting Check Status:

<http://aac.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A3GG2asm4A6BUTX1F6A9IIcdGJ3RnkRtZgIMzdAZ>

All authors must disclose any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. All funding sources for the project, institutional and corporate, and any potentially conflicting interests, such as relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results, must be acknowledged, both in the Acknowledgments section and on this form. The corresponding author must review this policy with all coauthors.

The author submitting the manuscript must state in the submission form whether or not any of the authors has a conflict of interest. Here is how Dr. de Campos responded:

Conflict of Interest: No conflict of interest. If you have a conflict of interest that is not disclosed here, please notify the journal staff immediately at nlin@asmusa.org

To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL:
http://www.asm.org//components/com_php/files/editors.php

In submitting your manuscript to AAC, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Corresponding authors who are active ASM members at the Contributing or Premium level are entitled to discounted page charges, reprint fees, and color figure fees. If your manuscript is accepted for publication in a 2013 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$67 per printed page for the first eight pages and \$125 for each page in excess of eight for a corresponding author who is such an ASM member or \$80 per printed page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight for a nonmember or Supporting member corresponding author. A corresponding author who is not a Contributing or Premium member may join ASM to obtain the member rate. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. For more details, including types of articles not charged, see the Instructions to Authors. Color charges for 2013 issues are \$170 per figure for a Contributing or Premium member

corresponding author and \$375 per figure for a nonmember or Supporting member corresponding author.

To offset the costs associated with publishing journal article supplemental material, ASM charges a flat fee for authors who wish to publish supplemental material as an adjunct to their published article. The 2014 fee is \$190 for a Contributing or Premium member corresponding author or \$285 for a nonmember or Supporting member corresponding author, with a limit of 10 supplemental files per article. (Exceptions: Minireviews and Commentaries are exempt from this fee.)

ASM is also now offering authors the option of paying a fee to allow immediate open access to both the preliminary "Accepts" version and the final, typeset version of their articles. The 2013 fee is \$2,000 for a Contributing or Premium member corresponding author or \$3,000 for a nonmember or Supporting member corresponding author, which is in addition to current publication charges. The open access provided through NIH's PubMed Central repository is separate and will continue regardless; all primary research published in ASM journals is freely available through PubMed Central 6 months after publication. You may contact the ASM production editor if you wish to pay the optional open access fee.

IMPORTANT NOTICE: For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called "AAC Accepts" and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset versions are published. They are posted "As Is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and corrections/changes are NOT accepted. Accordingly, there may be differences between the AAC Accepts version and the final, typeset version. The manuscripts remain listed on the AAC Accepts page until the final, typeset versions are posted, at which point they are removed from the AAC Accepts page. Any supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

Thank you for submitting your work to Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Regards,

AAC staff

APÊNDICE A – Resumos Publicados em Congressos.

Bonez, P.C.; **Flores, V.C.**; Marques, B.M.; Siqueira, F.S.; Bianchini, B.V.; Dalmolin, T.V.; Righi, R.A.; Campos, M.M.A. Perfil de suscetibilidade à claritromicina em isolados clínicos de Micobactérias Não Tuberculosas de Crescimento Rápido. In: XXVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal.

Campos, M.M.A.; **Flores, V.C.**; Siqueira, F.S., Bonez, P.C.; Marques, B.M.; Bianchini, B.V.; Rossi, G.G.; Salla, A. Determinação da suscetibilidade ao ciprofloxacino por método de microdiluição em caldo em Micobactérias de Crescimento Rápido. In: XXVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal.

Marques, J. B.; **Flores, V. C.**; Bonez, C.P.; Siqueira, F.S.; Varelli, C.S.; Mizdal, C.R.; Rossi, G.G.; Campos, M.M.A. Atividade do sulfametoxazol em Micobactérias de Crescimento Rápido. In: XXVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal.

Marques, J. B.; **Flores, V. C.**; Siqueira, F.S.; Bonez, C.P.; Righi, B.H.; Agertt, V.A.; Dalmolin, T.V.; Campos, M.M.A. Teste de suscetibilidade à doxiciclina em isolados clínicos de Micobactérias de Crescimento Rápido. In: XXVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal.

Siqueira, F. S.; **Flores, V. C.**; Bianchini, B. V.; Rossi, G. G.; Campos, M. M. A. Identificação de isolados clínicos de micobactérias por métodos fenotípicos. XXVIII Jornada Acadêmica Integrada, 2013, Santa Maria.