



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



**SAL DE TETRAZÓLIO COMO INDICADOR COLORIMÉTRICO PARA A
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
EM CEPAS DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS**

Mariana Quaresma de Souza

Rio Grande, 2022



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



**SAL DE TETRAZÓLIO COMO INDICADOR COLORIMÉTRICO PARA A
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
EM CEPAS DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS**

Mariana Quaresma de Souza

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

Orientadora: Profa. Dra. Ivy Bastos Ramis de Souza

Rio Grande, 2022

Ficha Catalográfica

S729s Souza, Mariana Quaresma de.
Sal de tetrazólio como indicador colorimétrico para a
determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em
cepas de micobactérias não tuberculosas / Mariana Quaresma de
Souza. – 2022.

87 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio
Grande/RS, 2022.

Orientadora: Dra. Ivy Bastos Ramis de Souza.

1. Cloreto de trifenil tetrazólio 2. Concentração inibitória mínima
3. Formazan 4. *Mycobacterium* I. Souza, Ivy Bastos Ramis de
II. Título.

CDU 547.79

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Mariana Quaresma de Souza

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

**SAL DE TETRAZÓLIO COMO INDICADOR COLORIMÉTRICO PARA A
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
EM CEPAS DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS**

Banca examinadora

Profa. Dra. Erica Chimara Silva (Externo – Instituto Adolfo Lutz)

Profa. Dra. Andrea von Groll (Titular – FURG)

Pós-Doutoranda Júlia Silveira Vianna (Suplente – FURG)

Orientadora: Profa. Dra. Ivy Bastos Ramis de Souza

Rio Grande, 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela oportunidade de ter uma formação acadêmica de qualidade.

Aos membros do Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, pelos anos de apoio acadêmico, ensinamentos e amizade.

À Prof. Dra. Ivy Bastos Ramis de Souza, por todo ensinamento compartilhado e pela confiança depositada em mim ao longo dos últimos anos.

À minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram durante essa etapa acadêmica. Muito obrigada.

RESUMO

As infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT) caracterizam-se por serem oportunistas e de tratamento complexo. Reconhece-se que a identificação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos da cepa causadora da infecção é fundamental para a escolha do esquema terapêutico adequado. Nesse cenário, testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) colorimétricos vem se mostrando promissores por possibilitarem uma leitura mais fácil e precisa dos resultados. O objetivo do presente estudo foi avaliar o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) como indicador colorimétrico de viabilidade celular para a determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em cepas de MNT. Para isso, determinou-se o perfil de 34 cepas do complexo *Mycobacterium abscessus* (CMAB) frente a claritromicina, amicacina, ciprofloxacina, cefoxitina, doxiciclina, moxifloxacina e trimetoprima-sulfametoxazol; de 13 cepas do complexo *M. avium* (CMA) frente a amicacina e claritromicina; e de 7 cepas de *M. kansasii* frente a claritromicina e rifampicina. As cepas incluídas no estudo estavam armazenadas no Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio Grande e foram submetidas aos ensaios de microdiluição seriada em caldo com TTC e sem TTC (padrão-ouro, com leitura realizada através da visualização da turbidez). Pelo método padrão-ouro, as cepas de MNT apresentaram diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Ressalta-se que a maioria das cepas de CMAB apresentaram perfil resistente ou intermediário para os antimicrobianos testados, exceto para amicacina (97,1% das cepas foram sensíveis). Por outro lado, apenas uma cepa de CMA e uma de *M. kansasii* foram resistentes a claritromicina e rifampicina, respectivamente. Para a maioria das cepas de MNT houve concordância entre o ensaio com o TTC e o ensaio padrão-ouro: para ensaios com CMAB, concordância essencial entre 91% e 100% e concordância categórica entre 76% e 100%; para ensaios com CMA, concordância essencial entre 92% e 100% e concordância categórica entre 84% e 100%; e para ensaios com *M. kansasii*, concordância essencial de 100% e concordância categórica entre 85% e 100%. Além disso, o ensaio com o TTC possibilitou uma visualização e interpretação mais segura e sensível dos resultados. Portanto, trata-se de uma potencial alternativa de TSA para ser utilizada em laboratórios que realizam o diagnóstico de micobacterioses.

Palavras-chave: cloreto de trifenil tetrazólio, concentração inibitória mínima, formazan, *Mycobacterium*.

ODS contemplado: ODS 3 (Saúde e bem-estar)

ABSTRACT

Infections caused by nontuberculous mycobacteria (NTM) are characterized by being opportunistic and requiring complex treatment. It is recognized that the identification of the antimicrobial susceptibility profile of the strain causing the infection is essential for choosing the appropriate therapeutic regimen. In this scenario, colorimetric antimicrobial susceptibility testing (AST) have shown to be promising because they allow an easier and more accurate reading of the results. The aim of the present study was to evaluate 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) as a colorimetric indicator of cell viability to determine the antimicrobial susceptibility profile of NTM strains. For this, it was determined the profile of 34 strains of the *Mycobacterium abscessus* complex (MABC) against clarithromycin, amikacin, ciprofloxacin, ceftioxin, doxycycline, moxifloxacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole; of 13 strains of *M. avium* complex (MAC) against amikacin and clarithromycin; and 7 strains of *M. kansasii* against clarithromycin and rifampicin. The strains included in the study were stored at the Mycobacterial Laboratory of the Federal University of Rio Grande and were submitted to broth serial microdilution assays with TTC and without TTC (gold standard, with reading performed through the turbidity visualization). By the gold standard method, the NTM strains showed different susceptibility profiles to antimicrobials. It is noteworthy that most MABC strains showed a resistant or intermediate profile for the antimicrobials tested, except for amikacin (97.1% of the strains were susceptible). On the other hand, only one strain of MAC and one of *M. kansasii* were resistant to clarithromycin and rifampicin, respectively. For most NTM strains there was agreement between the TTC assay and the gold standard assay: for MABC assays, essential agreement between 91% and 100% and categorical agreement between 76% and 100%; for MAC assays, essential agreement between 92% and 100% and categorical agreement between 84% and 100%; and for *M. kansasii* assays, essential agreement of 100% and categorical agreement between 85% and 100%. In addition, the TTC assay allowed for a safer and sensitive visualization and interpretation of the results. Therefore, it is a potential alternative of AST to be used in laboratories that perform the diagnosis of mycobacteriosis.

Keywords: formazan, minimum inhibitory concentration, *Mycobacterium*, triphenyl tetrazolium chloride.

SDG contemplated: SDG 3 (Health and well-being).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação de Runyon baseada no tempo de crescimento das micobactérias e na sua capacidade de produzir pigmentos.	15
Tabela 2.	Principais fontes de micobactérias não tuberculosas nos ambientes natural, doméstico e hospitalar.	16
Tabela 3.	Principais espécies de micobactérias não tuberculosas isoladas de infecções em humanos em estudos no Brasil.	20
Tabela 4.	Critérios do <i>American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America</i> para o diagnóstico de doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas.	21
Tabela 5.	Principais antimicrobianos utilizados no tratamento de micobacterioses e seus respectivos mecanismos de ação.	27
Tabela 6.	Esquema terapêutico indicado para o tratamento de doenças causadas por complexo <i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> e complexo <i>M. abscessus</i> pelo Ministério da Saúde.	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sítios das infecções causadas pelas micobactérias não tuberculosas e espécies relacionadas a cada manifestação. 11
- Figura 2.** Frequência das espécies de micobactérias não tuberculosas mais isoladas nos diferentes continentes. 19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMA	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
CMAB	Complexo <i>Mycobacterium abscessus</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
GPL	Glicopeptidolipídios
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, de <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
ITS	Região espaçadora transcrita interna
LPA	Ensaio de sonda linear, de <i>Line Probe Assays</i>
MALDI-TOF MS	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa
MH	Mueller-Hinton
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
PB	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay</i>
RGM	Micobactérias de crescimento rápido, de <i>rapidly growing mycobacteria</i>
RRDR	<i>Rifampicin resistance-determining region</i>
SGM	Micobactérias de crescimento lento, de <i>slowly growing mycobacteria</i>
STC	Cloreto de 2,3-difenil-5-tienil-(2)-tetrazólio
TB	Tuberculose
TSA	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
WST-1	sal de sódio de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Gênero <i>Mycobacterium</i> e as micobactérias não tuberculosas	14
2.2. Epidemiologia das infecções por micobactérias não tuberculosas e fatores de risco associados	17
2.3. Diagnóstico de infecção por micobactérias não tuberculosas	21
2.4. Tratamento das infecções por micobactérias não tuberculosas	26
2.5. Resistência aos antimicrobianos	31
2.6. Identificação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	33
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo geral	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. BIBLIOGRAFIA	38
5. MANUSCRITO	49
1 INTRODUCTION	52
2 MATERIALS AND METHODS	53
3 RESULTS	59
4 DISCUSSION	63
5 CONCLUSIONS	67
6 FUNDING	68
7 ACKNOWLEDGEMENTS	68
8 REFERENCES	68
6. CONCLUSÕES	79
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	80
APÊNDICE	81

1. INTRODUÇÃO

As micobacterioses, infecções causadas pelas micobactérias não tuberculosas (MNT) têm sido cada vez mais relatadas (CARNEIRO et al., 2018; SHARMA et al., 2020; ZWEIJPFENNING; HOEFSLOOT; INGEN, 2018), sendo estas consideradas emergentes mundialmente (BRASIL, 2021). As principais MNT relacionadas a infecções em humanos são as do complexo *Mycobacterium avium* (CMA), da espécie *M. kansasii* e do complexo *M. abscessus* (CMAB) (BALDWIN et al., 2019; CARNEIRO et al., 2018; GOLDENBERG et al., 2020).

As infecções causadas por MNT caracterizam-se por serem oportunistas e manifestam-se frequentemente na forma de doença pulmonar, semelhante a tuberculose (TB), tendo como principais sintomas a tosse produtiva, a dispneia, a hemoptise e a fadiga, podendo também ocorrer febre, perda de peso e sudorese noturna (DE MELLO et al., 2013; MOTA et al., 2020). No entanto, estas infecções também podem se manifestar em sítios extrapulmonares diversos e na forma de infecção disseminada (Figura 1) (BALDWIN et al., 2019; MOTA et al., 2017; SHARMA et al., 2020).

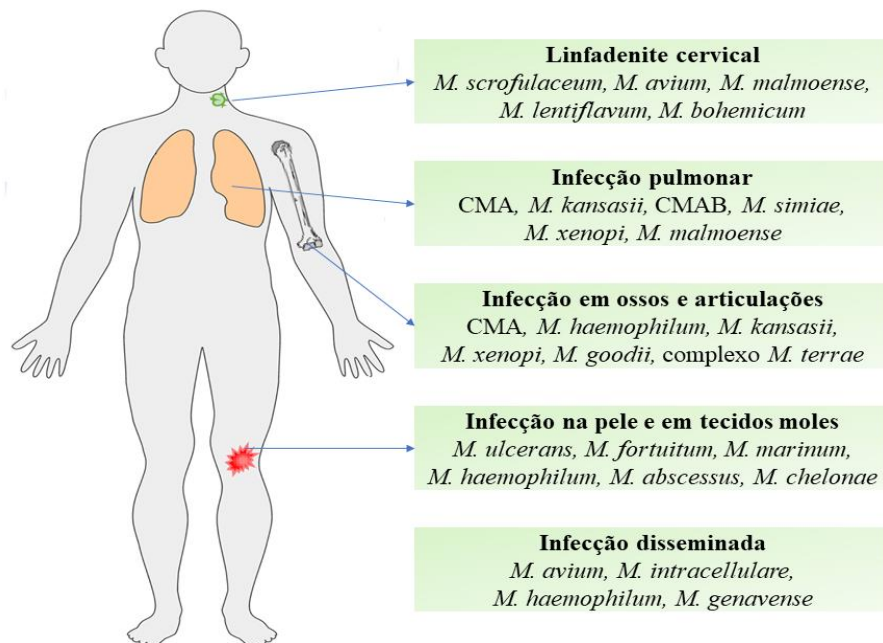


Figura 1. Sítios das infecções causadas pelas micobactérias não tuberculosas e espécies relacionadas a cada manifestação. CMA = Complexo *M. avium*; CMAB = Complexo *M. abscessus*. Adaptado de Baldwin al. (2019).

1 Apesar das infecções causadas pelas diferentes espécies de micobactérias se
2 manifestarem clinicamente de formas semelhantes, enfatiza-se que a conduta terapêutica varia
3 entre elas, pois as espécies e subespécies de MNT podem apresentar diferentes perfis de
4 suscetibilidade aos antimicrobianos. Nesse cenário, também se destaca as elevadas taxas de
5 resistência aos antimicrobianos incluídos no esquema terapêutico recomendado para o
6 tratamento das infecções por MNT, como frequentemente é observado em cepas do CMAB.
7 Dessa forma, além da identificação acurada do agente etiológico da infecção, a realização de
8 teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) como forma de identificar infecções
9 causadas por cepas resistentes é fundamental para a implementação do esquema terapêutico
10 adequado e para o melhor manejo do paciente com uma micobacteriose (AONO et al., 2019;
11 BALDWIN et al., 2019; GRIFFITH et al., 2007).

12 Atualmente, o ensaio preconizado como TSA para isolados de MNT é o ensaio de
13 microdiluição seriada em caldo (CLSI, 2018), porém o mesmo apresenta como inconveniente
14 a leitura dos resultados através da visualização de turbidez, o que pode gerar resultados
15 errôneos. Dessa forma, visando simplificar e otimizar a interpretação dos resultados, os
16 indicadores colorimétricos de viabilidade celular vêm sendo introduzidos nesses ensaios,
17 possibilitando a identificação de crescimento bacteriano através da mudança de coloração do
18 meio de cultivo (PARK et al., 2009; RAMIS et al., 2015; SHARMA et al., 2021).

19 Diversos TSA colorimétricos já foram padronizados para micobactérias, porém estes
20 são majoritariamente voltados para o complexo *M. tuberculosis* (CMTB) (KONTSEVAYA et
21 al., 2019; MARTIN; PORTAELS; PALOMINO, 2007), e somente alguns destes acabaram
22 sendo adaptados para as MNT, como é o caso da resazurina (JADAUN et al., 2007; RAMIS et
23 al., 2015; CASTILHO et al., 2015) e de alguns sais de tetrazólio (GOMEZ-FLORES et al.,
24 1995; LEE et al., 2007; TSUKATANI et al., 2015). Sabendo da importância de se estudar,
25 padronizar e avaliar indicadores colorimétricos de viabilidade celular acessíveis e de baixo
26 custo, que possibilitem a visualização dos resultados de forma mais fácil, confiável e segura, o
27 estudo desenvolvido na presente dissertação teve como objetivo avaliar o uso de um sal de
28 tetrazólio como indicador colorimétrico para a identificação do perfil de suscetibilidade aos
29 antimicrobianos em isolados clínicos de MNT.

30 O sal de tetrazólio avaliado no estudo já é amplamente utilizado na área da saúde,
31 especialmente em técnicas histológicas para a detecção de danos teciduais (principalmente nos
32 tecidos nervoso e cardíaco) (KAKIMOTO et al., 2013; LI; YU; LIANG, 2018) e em TSA para
33 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FERREIRA et al., 2018; KWIECIŃSKA-PIRÓG
34 et al., 2013). Na área da micobacteriologia, o mesmo já foi utilizado em ensaios com cepas do

1 CMTB (DE LOGU et al., 2001; MOHAMMADZADEH et al., 2006; SHINU; SINGH; NAIR,
2 2016), porém este será o primeiro estudo a avaliá-lo em um TSA com cepas de MNT.

3 O presente estudo foi desenvolvido junto ao Núcleo de Pesquisa em Microbiologia
4 Médica da Universidade Federal do Rio Grande, que possui como uma das áreas de atuação o
5 desenvolvimento e avaliação de métodos para o diagnóstico de micobacterioses e resistência
6 aos antimicrobianos. A dissertação apresentará uma revisão bibliográfica, discutindo aspectos
7 gerais relacionados às infecções causadas pelas MNT. Na sequência, após os objetivos do
8 estudo serem pontuados, os resultados obtidos, assim como as discussões sobre o uso do sal de
9 tetrazólio em TSA, serão apresentados em forma de manuscrito. Por fim, serão apresentados
10 dados relacionados com a produção complementar realizada durante o período do mestrado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Mycobacterium* e as micobactérias não tuberculosas

O gênero *Mycobacterium* (família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales) possui mais de 200 espécies; é constituído pelo CMTB, agente etiológico da TB, pelo *M. leprae*, agente etiológico da lepra, e pelas MNT, também conhecidas como micobactérias ambientais ou micobactérias atípicas (PARTE et al., 2020; TURENNE, 2019). Em 2018, foi proposta uma nova classificação taxonômica a partir da divisão do gênero *Mycobacterium* em cinco grupos, dando origem aos gêneros *Mycobacterium* (grupo *Tuberculosis-Simiae*), *Mycolicibacterium* gen. nov. (grupo *Fortuitum-Vaccae*), *Mycolicibacter* gen. nov. (grupo *Terrae*), *Mycolicibacillus* gen. nov. (grupo *Triviale*) e *Mycobacteroides* gen. nov. (grupo *Abscessus-Chelonae*) (GUPTA et al., 2018). No entanto, apesar dessa classificação ter sido validada pelo *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (OREN; GARRITY, 2018), o uso de *Mycobacterium* (atualmente sinônimo para os gêneros criados) permanece sendo utilizado para evitar confusão na prática clínica pela mudança na nomenclatura (MEEHAN et al., 2021).

As micobactérias são bacilos retos ou levemente curvados, aeróbios e não formadores de esporos (FORBES et al., 2018). Além disso, caracterizam-se por terem uma parede celular com complexa composição lipídica, cujo esqueleto é formado por arranjos de ácidos micólicos, arabinogalactanos e peptidoglicano. Esta parede celular proporciona impermeabilidade e hidrofobicidade a essas bactérias e, conseqüentemente, resistência a soluções álcool-ácidas. Por este motivo, as micobactérias são consideradas bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e não podem ser identificadas através da coloração de Gram, apesar de usualmente serem consideradas bacilos Gram-positivos (ABRAHAMS; BESRA, 2016; TRAN et al., 2019).

De modo geral, as micobactérias podem ser classificadas em micobactérias de crescimento rápido (RGM, de *rapidly growing mycobacteria*), quando crescem em até sete dias em meio de cultivo sólido e, em micobactérias de crescimento lento (SGM, de *slowly growing mycobacteria*), quando demandam mais que esse período para crescer em meio de cultivo sólido. Quando cultivadas, algumas espécies de MNT produzem colônias com pigmento amarelo ou laranja induzido pela exposição à luz (micobactérias fotocromogênicas) ou independentemente da luz (micobactérias escotocromogênicas), enquanto algumas não apresentam pigmento (micobactérias não cromogênicas) (FORBES et al., 2018; RUNYON,

1 1959). Baseando-se nessas características, Runyon (1959) categorizou as MNT em quatro
2 grupos, exemplificados na Tabela 1.

3

4 **Tabela 1.** Classificação de Runyon baseada no tempo de crescimento das micobactérias e na
5 sua capacidade de produzir pigmentos.

Classificação	Tempo de crescimento	Produção de pigmento	Exemplos de MNT
Grupo I (Fotocromogênicas)	Lento	Sim (amarelo ou laranja induzido pela exposição à luz)	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i>
Grupo II (Escotocromogênicas)	Lento	Sim (amarelo ou laranja independentemente da luz)	<i>M. szulgai</i>
Grupo III (Não cromogênicas)	Lento	Não	Complexo <i>M. avium</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. ulcerans</i>
Grupo IV	Rápido	-	Complexo <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. franklinii</i>

6 Adaptado de Runyon (1959).

7

8 As MNT são majoritariamente saprófitas, porém algumas espécies são patogênicas
9 obrigatórias em animais e patogênicas oportunistas em humanos (TURENNE, 2019). Entre as
10 principais MNT causadoras de infecção em humanos estão o CMA, a espécie *M. kansasii* e o
11 CMAB (BALDWIN et al., 2019; JEON, 2019). O CMA inclui as espécies *M. avium*, *M.*
12 *intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. vulneris*, *M. marseillense*, *M.*
13 *timonense*, *M. bouchedurhonense*, *M. yongonense*, *M. paraintracellulare* e *M. lepraemurium*.
14 Destas, as principais causadoras de infecções em humanos são *M. avium* e *M. intracellulare*
15 (VAN INGEN et al., 2018). O CMAB, por sua vez, é composto por três subespécies causadoras
16 de infecções em humanos, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e
17 *M. abscessus* subsp. *bolletii* (TORTOLI et al., 2016), sendo a maioria dos isolados clínicos
18 pertencentes às duas primeiras (TURENNE, 2019).

19 De modo geral, as MNT podem ser ubiqüamente encontradas em fontes ambientais
20 naturais, bem como em ambiente doméstico e hospitalar (CARDOSO et al., 2008; GEBERT et
21 al., 2018; SANTOS et al., 2015) (Tabela 2). Bacilos de MNT são geralmente adquiridos do

1 ambiente por meio de ingestão, inalação e contato dérmico. Devido à hidrofobicidade da célula
 2 micobacteriana, as MNT são facilmente aerossolizadas, e sugere-se que a inalação desses
 3 aerossóis seja a principal via de doença pulmonar por MNT (JEON, 2019; PEREIRA et al.,
 4 2020). Em 2016, Bryant et al. (2016) demonstraram com a utilização do sequenciamento do
 5 genoma de isolados do CMAB, provenientes de pacientes com fibrose cística de sete países,
 6 que a maioria das infecções foi adquirida por meio de fômites e aerossóis. Os pesquisadores
 7 demonstraram que os aerossóis de longa duração formados a partir da tosse dos pacientes com
 8 fibrose cística infectados por CMAB eram potencialmente infecciosos.

9
 10 **Tabela 2.** Principais fontes de micobactérias não tuberculosas nos ambientes natural, doméstico
 11 e hospitalar.

Tipo de fonte	Fonte
Ambiente natural	Água natural em lagos, rios, córregos e pântanos; solos e poeira dos solos.
Ambiente doméstico	Água potável e proveniente de chuveiros e torneiras (usadas em banheiras, spas, piscinas, umidificadores).
Ambiente hospitalar	Sistemas de distribuição de água e dispositivos médicos contaminados.

12 Adaptada de Jeon (2019).

13
 14 A persistência das MNT no ambiente é resultado principalmente da sua parede celular
 15 altamente hidrofóbica e impermeável, promovendo uma barreira a agentes estressores (como
 16 antimicrobianos, desinfetantes, mudanças osmóticas, de pH e de temperatura) (CARDOSO et
 17 al., 2008; GEBERT et al., 2018; QVIST et al., 2015; SANTOS et al., 2015). O seu metabolismo
 18 também desempenha um papel importante na resistência das MNT no ambiente, pois as
 19 micobactérias possuem um crescimento lento quando comparado a outras bactérias ambientais
 20 e podem entrar em estado de dormência como forma de proteção em ambientes hostis. Além
 21 disso, as MNT possuem a capacidade de formação de biofilme, permitindo a colonização de
 22 superfícies (JEON, 2019; PEREIRA et al., 2020).

23 O biofilme, que consiste em comunidades bacterianas em uma matriz extracelular
 24 autoproduzida composta principalmente por glicopeptidolipídios (GPL), também pode ser
 25 importante para as MNT em colonizações *in vivo* (NIÑO-PADILLA; VELAZQUEZ;
 26 GARIBAY-ESCOBAR, 2021). Um estudo conduzido por Qvist et al. (2015) evidenciou que as
 27 subespécies do CMAB são capazes de formar biofilme nas paredes alveolares dos pulmões de

1 pacientes com fibrose cística, estando, portanto, intimamente ligadas às infecções pulmonares
2 crônicas (QVIST et al., 2015). Posteriormente, a formação de biofilme por CMAB também foi
3 relatada em cavidades pulmonares de um paciente com doença pulmonar obstrutiva crônica
4 (FENNELLY et al., 2016).

5 Nesse contexto, os GPL assumem um papel além da constituição do biofilme, sendo
6 importantes na patogênese dessas micobactérias. Os GPL são glicolipídios presentes na
7 superfície celular das MNT, e relata-se para algumas espécies de MNT, como membros do
8 CMA e do CMAB, que a variação da sua expressão pode determinar a transição entre
9 morfotipos liso (com GPL) ou rugoso (sem GPL) das colônias. Aponta-se o morfotipo liso
10 como colonizador, pois a presença de GPL regula a resposta imunológica do hospedeiro,
11 mascarando a presença de outros lipídios de superfície envolvidos na virulência
12 micobacteriana, além de estar associada a formação de biofilme e a motilidade; e o morfotipo
13 rugoso como invasivo e virulento, por estar associado a multiplicação intracelular, formação de
14 agregados bacterianos e a indução da resposta imune (LI et al., 2020; MUKHERJEE;
15 CHATTERJI, 2012; NISHIMURA et al., 2020; TRAN et al., 2019).

16 Os GPL dos membros do CMA, diferentemente dos GPL das demais MNT, podem
17 possuir diferenças estruturais no componente oligossacarídeo, resultando na divisão destas
18 micobactérias em serotipos. Atualmente, mais de 31 serotipos foram reconhecidos em cepas do
19 CMA, e além de poderem ser diferenciados por técnicas de serotipagem, podem variar quanto
20 a imunogenicidade (MUKHERJEE; CHATTERJI, 2012; TRAN et al., 2019). O serotipo 4, por
21 exemplo, é encontrado em cepas de *M. avium* e está relacionado a um pior prognóstico de
22 doença pulmonar quando comparado a outros serotipos. Um estudo de coorte incluindo
23 pacientes com doença pulmonar por CMA observou que pacientes infectados com o serotipo 4
24 de *M. avium* não responderam efetivamente a terapia com múltiplos antimicrobianos, além de
25 apresentarem piora da doença a partir dos achados radiológicos (MAEKURA et al., 2005).

27 **2.2. Epidemiologia das infecções por micobactérias não tuberculosas e fatores de risco** 28 **associados**

29
30 Em diversos países, como o Brasil, a notificação de casos de infecções por MNT aos
31 sistemas de saúde não é obrigatória, o que torna o entendimento sobre o cenário epidemiológico
32 dessas infecções no mundo um desafio. Apesar disso, estudos em diferentes regiões vêm
33 relatando um aumento na incidência de infecções por MNT (CARNEIRO et al., 2018;
34 SHARMA et al., 2020; ZWEIJPFENNING; HOEFSLOOT; INGEN, 2018). O aumento na

1 incidência dessas infecções teve início no fim do século passado, e entre os fatores que podem
2 ter contribuído para isso estão a melhoria dos métodos laboratoriais capazes de isolar e
3 identificar micobactérias; conscientização de clínicos sobre as micobacterioses; aumento no
4 número de publicações sobre essas infecções; e fatores do patógeno (como aumento da
5 virulência devido a mutações) e do hospedeiro (como o aumento da população
6 imunocomprometida e/ou com idade avançada) (RIVERO-LEZCANO; GONZÁLEZ-
7 CORTÉS; MIRSAEIDI, 2019; SHARMA et al., 2020).

8 Apesar de também poderem afetar indivíduos imunocompetentes, as infecções por MNT
9 acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos, se desenvolvendo mais
10 progressivamente e podendo ocasionar doença disseminada. A infecção por HIV, associada a
11 contagem de linfócitos T CD4 <50 células/mm³, é a principal condição de risco para o
12 desenvolvimento de infecções por MNT (PROCOP, 2017). Assim como a infecção por HIV,
13 anormalidades estruturais, como bronquiectasias, doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose
14 cística também são fatores de risco para o surgimento de infecção/doença pulmonar por MNT.
15 Uma vez que a TB pode gerar sequelas pulmonares, a realização de tratamento prévio para TB
16 também é um fator de risco (CARNEIRO et al., 2018; GOLDENBERG et al., 2020).

17 O perfil clínico-epidemiológico de pacientes infectados com MNT é variável. Em
18 relação ao sexo dos pacientes, as infecções por MNT são mais frequentes em homens (PEDRO
19 et al., 2017; SANTIN et al., 2018), porém em alguns locais a prevalência pode ser maior em
20 mulheres (DA COSTA et al., 2013; MONTEIRO et al., 2018). Em homens, a infecção/doença
21 pulmonar por MNT frequentemente está associada ao tabagismo e doença pulmonar pré-
22 existente, enquanto em mulheres está associada ao período pós-menopáusico (GOLDENBERG
23 et al., 2020; SHARMA et al., 2020). Além disso, apesar de também poderem ocorrer em
24 pacientes pediátricos (MAUCH et al., 2020), a frequência das infecções causadas por MNT é
25 diretamente proporcional a faixa etária dos pacientes, sendo esta majoritariamente acima de 50
26 anos (DA COSTA et al., 2013; GOLDENBERG et al., 2020; PEDRO et al., 2017; SANTIN et
27 al., 2018). Supõe-se que a maior prevalência de infecções por MNT em pacientes de maior faixa
28 etária está relacionada à maior longevidade da população em geral e às comorbidades
29 associadas à idade (GOLDENBERG et al., 2020).

30 Em relação às espécies de MNT isoladas de infecções, apesar do CMA ser o principal
31 grupo de MNT causador de infecções em humanos em todos os continentes, observa-se uma
32 variação na distribuição das espécies de MNT entre países e regiões (Figura 2).

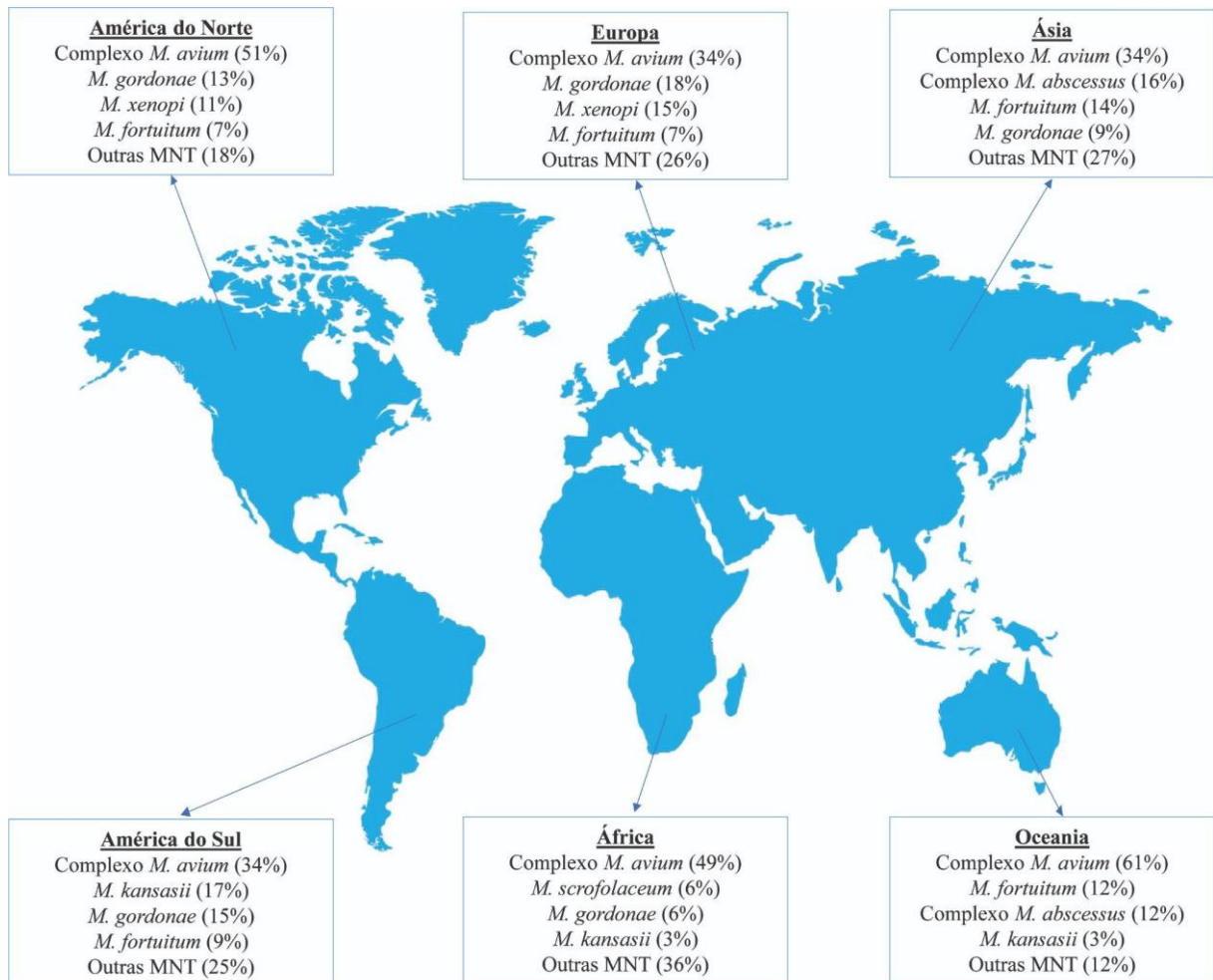


Figura 2. Frequência das espécies de micobactérias não tuberculosas mais isoladas nos diferentes continentes. Adaptado de Zweijpfenning, Hoefsloot & Ingen (2018).

No Brasil, estudos em diversos estados apontam que CMA, CMAB e *M. kansasii* são as MNT mais isoladas (Tabela 3) (CARNEIRO et al., 2018; DE MELLO et al., 2013; MARQUES; FERRAZOLI; CHIMARA, 2019). No país, as espécies do CMA, principalmente o *M. avium*, são as MNT mais frequentemente relacionadas a infecções em pacientes HIV positivos (CARNEIRO et al., 2018; BUSATTO et al., 2020). Por outro lado, a espécie *M. kansasii* está mais frequentemente relacionada a pacientes com comorbidades pulmonares (GOLDENBERG et al., 2020).

Já as subespécies do CMAB, diferentemente do padrão observado da América do Sul (Figura 2), vem sendo amplamente relatadas no país nos últimos anos (Tabela 3). Estas, além de serem causadoras de doenças pulmonares de difícil prognóstico (MONTEIRO et al., 2018), estão frequentemente associadas a infecções resultantes de surtos nosocomiais relatados em diversos estados, especialmente entre os anos de 2006 e 2008, principalmente após

1 procedimentos invasivos utilizando material contaminado. Dessa forma, entre medidas
 2 adotadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para o controle e contenção desses
 3 surtos, está a notificação compulsória no país de infecções por RGM relacionadas a serviços de
 4 saúde (ANVISA, 2014; CARDOSO et al., 2008; NUNES et al., 2014; PINHEIRO; SETÚBAL;
 5 OLIVEIRA, 2019).

6

7 **Tabela 3.** Principais espécies de micobactérias não tuberculosas isoladas de infecções em
 8 humanos em estudos no Brasil.

Período do estudo	Estado	Tipo de amostra	Espécies	Referências
1993 - 2011	Rio de Janeiro	Pulmonar	<i>M. kansasii</i> , CMA, <i>M. abscessus</i> e <i>M. fortuitum</i>	DE MELLO et al., 2013
1998 - 2003	Bahia	Pulmonar	<i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , CMA e <i>M. kansasii</i>	MATOS et al., 2004
2000 - 2009	São Paulo	Pulmonar e extrapulmonar	<i>M. avium</i> e CMAB	PEDRO et al., 2017
2003 - 2013	Pará	Pulmonar	CMAB e CMA	MONTEIRO et al., 2018
2003-2013	Rio Grande do Sul	Pulmonar	CMA, <i>M. kansasii</i> e <i>M. abscessus</i>	CARNEIRO et al., 2018
2005 - 2016	Ceará	Pulmonar e extrapulmonar	<i>M. avium</i> e <i>M. fortuitum</i>	MOTA et al., 2020
2008 - 2010	Rondônia	Pulmonar	<i>M. abscessus</i> , <i>M. avium</i> e <i>M. fortuitum</i>	DE LIMA et al., 2013
2010 - 2011	Pará	Pulmonar	CMAB e CMA	DA COSTA et al., 2013
2011-2014	São Paulo	Pulmonar	<i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. avium</i> e <i>M. szulgai</i>	MARQUES; FERRAZOLI; CHIMARA, 2019
2014 - 2016	Rio Grande do Sul	Pulmonar e extrapulmonar	<i>M. avium</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. gastri</i> e <i>M. kansasii</i>	BUSATTO et al., 2020

9 CMA = Complexo *M. avium*; CMAB = Complexo *M. abscessus*.

10

2.3. Diagnóstico de infecção por micobactérias não tuberculosas

Os critérios utilizados para o diagnóstico de infecção por MNT mundialmente permanecem baseados nas recomendações da *American Thoracic Society (ATS)* e da *Infectious Diseases Society of America (IDSA)*. Conhecer a significância clínica de uma MNT isolada de uma amostra é fundamental para saber se trata-se de colonização ou doença. Entre os fatores que podem representar significância clínica do isolamento de MNT estão a obtenção do isolado a partir de várias amostras ou sítios, a visualização de BAAR através de microscopia, ou a obtenção do isolado a partir de um sítio estéril como, por exemplo, o sangue. Para estabelecer o diagnóstico de doença pulmonar causada por MNT, uma série de critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos devem ser seguidos, conforme apresentado na Tabela 4 (GRIFFITH et al., 2007).

Tabela 4. Critérios do *American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America* para o diagnóstico de doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas.

Tipo de achado	Critérios diagnósticos
Clínico	Sintomas (como tosse, produção de escarro, fadiga, mal-estar, dispneia, febre, hemoptise, dor torácica e perda de peso) associado a exclusão de outros diagnósticos, como tuberculose e malignidade pulmonar.
Radiológico	Radiografia de tórax mostrando opacidades nodulares ou cavitárias ou tomografia computadorizada de alta resolução mostrando bronquiectasias multifocais com múltiplos nódulos pequenos.
Microbiológico	<p>Para escarro, cultura positiva de pelo menos duas amostras expectoradas separadas.</p> <p>Para lavado broncoalveolar, resultado positivo de cultura de pelo menos uma amostra.</p> <p>Para uma biópsia, cultura positiva associada a características histopatológicas micobacterianas (inflamação granulomatosa ou presença de bacilos álcool-ácido resistentes), e na ausência de cultura positiva, histopatologia associado a um ou mais escarros ou lavados broncoalveolares com cultura positiva.</p>

Adaptado de Griffith et al. (2007).

1 Enfatiza-se que a identificação da espécie da MNT isolada é fundamental para o
2 reconhecimento da sua significância clínica, pois se sabe que algumas espécies de MNT são
3 saprófitas ou patógenos humanos incomuns. Além disso, a identificação da espécie causadora
4 da infecção é fundamental para nortear a escolha do tratamento adequado, uma vez que as
5 espécies de MNT apresentam diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Dessa
6 forma, apesar de achados clínicos e radiológicos serem importantes para o diagnóstico de
7 infecção por MNT, a confirmação microbiológica é essencial para definir a etiologia da
8 infecção (GRIFFITH et al., 2007).

9 O passo inicial para a identificação microbiológica da MNT causadora da infecção é a
10 identificação de BAAR na amostra clínica. A baciloscopia é um método simples, de baixo custo
11 e amplamente utilizado no diagnóstico das micobacterioses. A técnica baseia-se na
12 identificação de BAAR através de microscopia após coloração pelo método de Ziehl Neelsen.
13 Apesar de ser um método com sensibilidade reduzida, pode ser uma ferramenta importante na
14 identificação de infecção por MNT em locais com recursos limitados, pois amostra positiva
15 pela baciloscopia e negativa por outros métodos de identificação do CMTB é indicativa de
16 presença de MNT. No entanto, a baciloscopia possui a limitação de não possibilitar a
17 identificação da espécie do BAAR detectado (ARORA; DHANASHREE, 2020; DESIKAN et
18 al., 2017).

19 A cultura, quando comparada à microscopia, é um método que demanda um maior
20 tempo para a liberação de resultado, além de exigir uma infraestrutura laboratorial mais
21 complexa, incluindo equipamentos específicos (como incubadora e cabine de biossegurança) e
22 técnicos com competências adicionais. No entanto, trata-se de uma técnica mais sensível e
23 específica, que possibilita o isolamento da micobactéria para que posteriormente seja feita a
24 identificação da espécie e a testagem do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (AFSAR
25 et al., 2018; OMS, 2015).

26 O cultivo pode ser realizado em meios sólidos, como meios à base de ovo (Ogawa-
27 Kudoh e Lowenstein-Jensen) e à base de ágar (Middlebrook 7H10, 7H11 e Mueller-Hinton
28 (MH)), ou em meios líquidos como caldo MH e caldo Middlebrook 7H9 (FORBES et al., 2018;
29 GRIFFITH et al., 2007). Culturas em meio líquido apresentam como vantagem um maior
30 rendimento de crescimento micobacteriano e resultados mais rápidos quando comparados aos
31 cultivos em meio sólido. Entretanto, o uso do meio sólido possibilita a determinação da taxa de
32 crescimento dos microrganismos, a quantificação e observação da morfologia das colônias, e a
33 identificação de infecções mistas (com mais de uma espécie de micobactéria) (GRIFFITH et
34 al., 2007).

1 O tempo de crescimento dos cultivos micobacterianos é uma das características que
2 pode nortear a identificação das MNT. A maioria das SGM apresenta crescimento entre duas a
3 três semanas em meio sólido, com exceção das espécies *M. ulcerans* e *M. genavense*, que
4 necessitam de um período maior de incubação. As RGM, por sua vez, frequentemente
5 apresentam crescimento dentro de uma semana. Enfatiza-se que, em meio líquido, estes
6 períodos de tempo podem ser reduzidos (FORBES et al., 2018; GRIFFITH et al., 2007). Após
7 a obtenção do crescimento micobacteriano, recomenda-se que a ausência do CMTB seja
8 confirmada por testes imunocromatográficos, para que, subsequentemente, seja realizada a
9 identificação da espécie de MNT (OMS, 2015; SHARMA; UPADHYAY, 2020).

10 Inicialmente, métodos como ensaios bioquímicos e cromatografia líquida de alta
11 eficiência (HPLC, de *High Performance Liquid Chromatography*) eram utilizados para a
12 identificação fenotípica de MNT. Os ensaios bioquímicos convencionais são baseados na
13 identificação de produtos de reações bioquímicas, e exemplos destes são o ensaio da redução
14 do nitrato, o ensaio da acumulação de niacina e o ensaio do crescimento em ágar MacConkey
15 na ausência do cristal violeta (BHALLA et al., 2018; SEBASTIAN et al., 2018). No entanto,
16 atualmente, o uso destes ensaios bioquímicos é desencorajado por estes serem laboriosos,
17 demorados e apresentarem acurácia reduzida, além de não serem capazes de diferenciar
18 algumas espécies de MNT (FORBES et al., 2018).

19 O HPLC, por sua vez, é um método baseado na análise de padrões dos ácidos micólicos
20 presentes na parede celular micobacteriana. Trata-se de um método mais rápido que os ensaios
21 bioquímicos convencionais (média de 5 dias para gerar resultado *versus* 14 dias,
22 respectivamente) (SEBASTIAN et al., 2018), porém exige maior *expertise* técnica e
23 infraestrutura laboratorial para a sua execução. Além disso, o ensaio possui a limitação de ter
24 poder discriminatório reduzido para diferenciar espécies de MNT intimamente relacionadas,
25 como por exemplo, os membros do CMA e do CMAB. Por esse motivo, seu uso passou a ser
26 substituído por métodos moleculares (FORBES et al., 2018; SUBEDI et al., 2016; TONEY;
27 TONEY; BUTLER, 2010).

28 Ensaios baseados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são amplamente
29 utilizados na identificação de espécies de MNT. O ensaio de PCR com análise do padrão de
30 restrição enzimática foi amplamente utilizado para a identificação de espécies de MNT
31 (GIFFITH et al., 2007). Trata-se de um método baseado na amplificação de um fragmento de
32 439 pares de base (pb) do gene *hsp65* por PCR, seguida pela digestão do produto amplificado
33 com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (TELENTI et al., 1993). No entanto, uma vez que
34 os tamanhos dos fragmentos resultantes são avaliados visualmente, a observação de fragmentos

1 pequenos e de pequenas diferenças de tamanhos de fragmentos, pode ser difícil. Além disso,
2 padrões de restrição desconhecidos podem ser observados, tornando necessária a realização de
3 ensaios adicionais para a identificação da espécie da micobactéria (APPAK et al., 2018; LIU et
4 al., 2016).

5 Nesse cenário, a detecção de sequências através de PCR convencional também é uma
6 alternativa para a diferenciação entre micobactérias. A partir de uma mesma região ou gene,
7 sequências espécies-específicas podem ser amplificadas, como mostra Singh et al (2020), que
8 sintetizou diferentes *primers* para a região espaçadora transcrita interna (ITS) entre os genes
9 16S-23S *rRNA* visando identificar *M. kansasii*, *M. abscessus* e o CMA (SINGH et al., 2020).
10 Outras sequências também podem ser amplificadas para identificar membros de um mesmo
11 complexo, para o CMAB, o gene *erm(41)* é utilizado para diferenciar isolados de *M. abscessus*
12 subsp. *massiliense* de isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus/bolletii* através da diferença
13 no tamanho dos fragmentos (397 pb e 673 pb, respectivamente) (KIM et al., 2010); e para o
14 CMA, são utilizadas as regiões DT6 (para *M. avium*) e DT1 (para *M. intracellulare* e alguns
15 serotipos de *M. avium*), com 187 pb e 666 pb, respectivamente (THIERRY et al., 1993).

16 Visando otimizar o procedimento e o tempo para obtenção de resultados, ensaios de
17 PCR multiplex vêm sendo propostos para a identificação das principais MNT de interesse
18 clínico (CHAE et al., 2017; KIM et al., 2021a; SINGH et al., 2020). Chae et al. (2017), por
19 exemplo, desenvolveu um ensaio no qual foram incluídos pares de *primers* que possibilitaram
20 a identificação do gênero *Mycobacterium*, a diferenciação entre CMTB e MNT, a identificação
21 de cepas de *M. tuberculosis* da família Beijing e de MNT de interesse clínico (*M. avium*, *M.*
22 *intracellulare*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. kansasii*).
23 Métodos com essa abordagem são promissores para serem utilizados na rotina diagnóstica e
24 possibilitarem a identificação da espécie a partir de cultivos de forma mais rápida e simplificada
25 (CHAE et al., 2017).

26 Entre os métodos moleculares, também estão disponíveis os ensaios de sonda linear
27 (LPA, de *Line Probe Assays*), baseados na detecção de sequências de DNA através de
28 hibridização reversa. Para isso, após amplificação do material genético por PCR, são utilizadas
29 sondas de nucleotídeos, fixadas em membrana de nitrocelulose, que irão hibridizar com regiões
30 alvos do DNA das espécies de micobactérias para a identificação das mesmas (KAKHKI et al.,
31 2020; OMS, 2015). Diversos LPA estão disponíveis comercialmente para a identificação de
32 MNT (FORBES et al., 2018), sendo o INNO-LiPA *Mycobacteria* (Fujirebio, Bélgica) e o
33 GenoType CM/AS (Hain Lifescience, Alemanha) os mais utilizados atualmente. A partir do
34 DNA extraído de cultivos bacterianos, o ensaio INNO-LiPA é capaz de identificar 16 espécies

1 de micobactérias através da amplificação do ITS entre os genes 16S-23S *rRNA*. Diferentemente,
2 o ensaio GenoType tem como alvo uma região do gene 23S *rRNA* e é dividido em dois kits, o
3 kit CM (identifica 15 espécies de micobactérias) e o kit AS (identifica 16 espécies adicionais
4 de micobactérias) (KIM; SHIN, 2020).

5 Além dos ensaios LPA comerciais, o uso de LPA *in-house* também vem sendo proposto
6 como uma alternativa mais barata. Um estudo piloto mostrou que o LPA *in-house* proposto foi
7 capaz de identificar espécies de MNT, através da região ITS, de forma rápida (em 4 horas),
8 específica e com custo reduzido. Além disso, também se mostrou eficaz quando utilizado a
9 partir de cultivos ou de amostras clínicas, mostrando ser um ensaio promissor para a
10 identificação de infecções micobacterianas em laboratórios clínicos (KAKHKI et al., 2020).

11 Apesar dos LPA serem ensaios úteis para a identificação das principais MNT de
12 interesse clínico, pode acontecer reação cruzada entre espécies similares, resultando em
13 identificação errônea. Além disso, também pode ocorrer a não diferenciação entre espécies
14 intimamente relacionadas, sendo o isolado classificado em complexos (HUH et al., 2019a).

15 Dessa forma, atualmente, o sequenciamento de DNA é o método mais aceito para a
16 identificação de MNT (FORBES et al., 2018; SHARMA et al., 2020). Frequentemente realiza-
17 se o sequenciamento parcial dos genes *hsp65*, *rpoB* e 16S *rRNA* e da região ITS (FORBES et
18 al., 2018; KIM et al., 2021a; SINGH et al., 2020). Este método pode fornecer uma identificação
19 mais específica a nível de espécie e subespécie quando comparado aos LPA (AHMAD;
20 MOKADDAS, 2019). Ademais, tem-se o sequenciamento do genoma total, que é um método
21 que vem sendo considerado padrão-ouro para a identificação de MNT, além de auxiliar em
22 investigações epidemiológicas e de resistência aos antimicrobianos. No entanto, ambos
23 métodos de sequenciamento possuem custo elevado e exigem *expertise* técnica, sendo não
24 acessíveis a maioria dos laboratórios clínicos (SHARMA et al., 2020).

25 Por fim, recentemente, o ensaio MALDI-TOF MS (ionização/dessorção a laser assistida
26 por matriz acoplada a espectrometria de massa) tem sido cada vez mais empregado na
27 identificação de MNT. Trata-se de um método relativamente rápido (com resultados entre 1 e
28 2 horas) capaz de identificar aproximadamente 160 espécies do gênero *Mycobacterium*,
29 baseando-se na análise do espectro de proteínas produzidas pelas mesmas. O MALDI-TOF é
30 capaz de identificar a maioria das MNT de interesse clínico de forma acurada, apesar de poder
31 falhar na diferenciação entre espécies intimamente relacionadas, como as subespécies do
32 CMAB e as espécies do CMA. O ensaio possui um custo inicial elevado devido a instalação do
33 equipamento para sua realização, porém é um método mais barato quando comparado a
34 métodos moleculares já utilizados, tornando-se um método promissor para ser implementado

1 em laboratórios clínicos (CONTRERAS et al., 2020; FORBES et al., 2018; NEUSCHLOVA et
2 al., 2017).

3

4 **2.4. Tratamento das infecções por micobactérias não tuberculosas**

5

6 O início do tratamento das infecções causadas pelas MNT deve levar em consideração,
7 além do diagnóstico de infecção/doença (GRIFFITH et al., 2007), uma análise de risco e
8 benefício, a qual inclui a avaliação da condição clínica do paciente, dos efeitos da terapia com
9 antimicrobianos no organismo e das chances de cura (BRASIL, 2021; DALEY et al., 2020). O
10 tratamento para infecções causadas por MNT envolve múltiplos antimicrobianos, podendo a
11 intervenção cirúrgica servir como um adjuvante em alguns casos (exceto para linfadenite em
12 crianças, cuja cirurgia é a principal escolha terapêutica) (SHARMA; UPADHYAY, 2020). A
13 terapia polimedicamentosa é fundamental para o tratamento das micobacterioses, afim de evitar
14 a resistência adquirida aos antimicrobianos, no entanto, apresenta um custo elevado, além de
15 elevada chance de efeitos adversos e toxicidade. Os antimicrobianos que compõem a terapia
16 polimedicamentosa podem ser de diferentes classes e seus mecanismos de ação encontram-se
17 sintetizados na Tabela 5 (DALEY et al., 2020).

1 **Tabela 5.** Principais antimicrobianos utilizados no tratamento de micobacterioses e seus
 2 respectivos mecanismos de ação.

Antimicrobianos	Mecanismo de ação	Alvo
Macrolídeos (claritromicina e azitromicina)	Inibição da síntese proteica	Ribossomo (subunidade 50S)
Aminoglicosídeos (amicacina e estreptomicina)	Inibição da síntese proteica	Ribossomo (subunidade 30S)
Rifamicinas (rifampicina e rifabutina)	Inibição da síntese de RNA	RNA polimerase (subunidade β)
Derivado de etilenodiamina (etambutol)	Inibição da síntese de arabinogalactano da parede celular	Arabinosil transferases
Fluoroquinolonas (moxifloxacina e ciprofloxacina)	Inibição da síntese de DNA	DNA girase
Oxazolidinona (linezolida)	Inibição da síntese proteica	Ribossomo (subunidade 50S)
Riminofenazina (clofazimina)	Disrupção da membrana celular, produção de espécies reativas de oxigênio	Membrana micobacteriana Ciclo redox
Diarilquinolina (bedaquilina)	Inibição da ATP sintase	ATPase

3 Adaptado de Huh et al. (2019b).

4

5 Os macrolídeos são a base do esquema terapêutico para o tratamento de infecções
 6 causadas pelo CMA, sendo tanto a claritromicina quanto a azitromicina, eficazes contra essa
 7 MNT (DALEY et al., 2020). Recentemente, uma meta-análise incluindo estudos utilizando
 8 esquema terapêutico com e sem macrolídeos para o tratamento de infecções causadas pelo
 9 CMA mostrou que a taxa de sucesso do tratamento (isto é, conversão de cultura positiva para
 10 cultura negativa e conclusão do tratamento planejado sem recaída) foi de 69% e 58,5%,
 11 respectivamente (NASIRI et al., 2020). Em comparação com a espécie *M. avium*, casos de
 12 infecção por *M. intracellulare* frequentemente se apresentam mais severos e com menor
 13 resposta ao tratamento (KOH et al., 2012). No entanto, o contrário também já foi observado
 14 (BOYLE et al., 2015; CHANG et al., 2020).

1 Dada a eficácia dos macrolídeos frente ao CMA, o esquema terapêutico adotado para as
2 infecções causadas por essa micobactéria deve prevenir o desenvolvimento de resistência a essa
3 classe de antimicrobianos. Nesse contexto, recomenda-se que o uso de macrolídeos seja
4 associado a etambutol e rifampicina (DALEY et al., 2020). Enfatiza-se que casos resistentes a
5 macrolídeos, que podem ser desencadeados pela adoção de esquema terapêutico inadequado
6 (como monoterapia com macrolídeo e esquema sem etambutol), são frequentemente tratados
7 com administração parenteral de aminoglicosídeos e intervenção cirúrgica, e possuem pior
8 desfecho de tratamento quando comparado a casos suscetíveis (taxa de conversão de cultura de
9 aproximadamente 21% *versus* 65,7%, respectivamente) (PARK et al., 2019).

10 A administração parenteral de aminoglicosídeos, como amicacina ou estreptomicina,
11 para o tratamento de infecções por CMA é reconhecida como uma intensificação da terapia
12 oral, sendo recomendada no início do tratamento de casos mais graves (DALEY et al., 2020).
13 Além disso, nos últimos anos, a amicacina vem sendo administrada via inalatória em casos de
14 doença pulmonar refratária, definida por doença em que não se consegue obter culturas de
15 escarro negativas após seis ou mais meses de um regime multidroga. A amicacina em aerossol
16 é vista como uma alternativa para o tratamento de doença pulmonar por MNT por reduzir as
17 chances de toxicidade sistêmica e aumentar a eficácia do antimicrobiano através do aumento
18 da sua concentração no tecido pulmonar. Recentemente, a amicacina lipossomal inalável foi
19 aprovada pela *Food and Drug Administration* para o tratamento de doença pulmonar refratária
20 por CMA (KHAN; CHAUDARY, 2020). Importante destacar que a amicacina lipossomal
21 inalável é fornecida a macrófagos pulmonares, vias aéreas e tecido pulmonar melhor do que a
22 amicacina não lipossomal (ZHANG et al., 2018).

23 Para o tratamento de infecções causadas por *M. kansasii*, recomenda-se um esquema
24 baseado na administração de rifampicina. Semelhantemente ao tratamento de infecções por
25 CMA, recomenda-se o uso de três antimicrobianos, os quais inclui rifampicina e etambutol,
26 associados à isoniazida ou claritromicina (DALEY et al., 2020). Casos resistentes à rifampicina,
27 apesar de já serem relatados e estarem relacionados à falha do tratamento dessas infecções, são
28 incomuns. Por outro lado, a taxa de resistência à etambutol se mostra elevada, porém não
29 influencia significativamente no desfecho do tratamento (BAKULA et al., 2018; DE
30 CARVALHO et al., 2019; GOLDENBERG et al., 2020).

31 Em caso de infecção por cepas de *M. kansasii* resistentes à rifampicina, a inclusão de
32 fluoroquinolonas no tratamento pode ser uma alternativa. De Carvalho et al. (2019) observou
33 que 100% dos isolados de *M. kansasii* se mostraram sensíveis à moxifloxacina. No entanto, no
34 mesmo estudo, foi observada elevada taxa de resistência à ciprofloxacina (51%), semelhante a

1 estudo anterior (BAKUŁA et al., 2018; DE CARVALHO et al., 2019). Dessa forma, apesar de
2 algumas fluoroquinolonas apresentarem boa atividade *in vitro* frente a isolados de *M. kansasii*,
3 ainda são necessários mais estudos em relação a sua eficácia na clínica (DALEY et al., 2020).

4 No caso de infecções causadas pelo CMAB, assim como para o CMA, os macrolídeos,
5 como claritromicina e azitromicina, são a base do tratamento. No entanto, o tratamento para
6 esse grupo de micobactérias permanece complexo. As cepas do CMAB, especialmente *M.*
7 *abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*, possuem alta taxa de resistência a
8 macrolídeos, podendo esta ser adquirida, através de mutação no gene *rrl*, ou induzida, através
9 da presença do gene *erm(41)* funcional (DALEY et al., 2020; GRIFFITH; DALEY, 2022). De
10 modo geral, duas meta-análises mostraram que a taxa de sucesso do tratamento de
11 micobacterioses por CMAB é insatisfatória, mesmo sendo superior para *M. abscessus* subsp.
12 *massiliense* (conversão da cultura em 79% e 56,7% dos casos) quando comparada a *M.*
13 *abscessus* subsp. *abscessus* (conversão da cultura em 35% e 33% dos casos) (KWAK et al.,
14 2019; PASIPANODYA et al., 2017).

15 Desta forma, recomenda-se que, associado ao macrolídeo, ao menos outros três
16 antimicrobianos devam ser utilizados no tratamento de micobacterioses causadas pelo CMAB,
17 sendo estes escolhidos com base na suscetibilidade das cepas *in vitro* (DALEY et al., 2020).
18 Após os macrolídeos, a amicacina é o antimicrobiano mais importante contra o CMAB, sendo
19 o antimicrobiano mais potente para ser utilizado em casos resistentes aos macrolídeos
20 (GRIFFITH; DALEY, 2022). A maioria dos casos são suscetíveis a esse antimicrobiano, e seu
21 uso está relacionado a uma melhora nos sintomas dos pacientes (KWAK et al., 2019). Nesse
22 cenário, destaca-se a substituição da amicacina parenteral pela amicacina inalatória,
23 principalmente na fase de manutenção do tratamento (KANG et al., 2021).

24 Desta maneira, a escolha de outros antimicrobianos efetivos que possam acompanhar a
25 claritromicina e a amicacina no tratamento de infecções por CMAB, para que a resistência
26 adquirida a esses antimicrobianos seja evitada, é uma prioridade e ao mesmo tempo um desafio
27 (GRIFFITH; DALEY, 2022). Agentes parenterais como imipenem, cefoxitina e tigeciclina
28 podem ser utilizados, bem como os antimicrobianos orais linezolida, clofazina, sulfametoxazol-trimetoprima, quinolonas (ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina) e
29 derivados de tetraciclina (doxiciclina, minociclina) (PASIPANODYA et al., 2017; KWAK et
30 al., 2019). No entanto, enfatiza-se que a melhor combinação de antimicrobianos para a fase de
31 manutenção do tratamento permanece desconhecida (GRIFFITH; DALEY, 2022).

32 O esquema terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde para o tratamento de
33 doenças causadas por MNT no Brasil tem duração total de pelo menos 18 meses, ou 12 meses
34

1 após a conversão bacteriológica, exceto para as RGM. Para essas micobactérias, o período de
 2 12 ou 18 meses corresponde a fase de manutenção, que é iniciada após a fase de ataque, que
 3 tem duração de 3 meses (Tabela 6) (BRASIL, 2021).

4

5 **Tabela 6.** Esquema terapêutico indicado para o tratamento de doenças causadas por complexo
 6 *M. avium*, *M. kansasii* e complexo *M. abscessus* pelo Ministério da Saúde.

Espécie	Antimicrobianos
CMA	<p>Esquema geral para apresentação clínica sem complicações Claritromicina^a, rifampicina^b (isolada ou, quando indisponível, em dose fixa combinada com isoniazida) e etambutol</p> <p>Esquema para apresentação clínica grave e cavitária Amicacina^c (por 3 a 6 meses, dependendo da evolução clínica), claritromicina, rifampicina^b (isolada ou, quando indisponível, em dose fixa combinada com isoniazida) e etambutol</p>
<i>M. kansasii</i>	<p>Esquema geral para apresentação clínica sem complicações (quando TSA não realizado) Rifampicina^b em dose fixa combinada com isoniazida, etambutol e claritromicina</p> <p>Esquema geral para apresentação clínica sem complicações (quando sensível a rifampicina) Rifampicina^b em dose fixa combinada com isoniazida^d e etambutol</p> <p>Esquema geral para apresentação clínica sem complicações (quando resistente a rifampicina) Isoniazida, etambutol e claritromicina</p> <p>Esquema para apresentação clínica grave e cavitária Amicacina^c (por 3 a 6 meses, dependendo da evolução clínica), rifampicina^b em dose fixa combinada com isoniazida, etambutol e claritromicina.</p>
CMAB	<p>Esquema geral para todas as apresentações clínicas (fase de ataque) Amicacina injetável, tigeciclina, imipenem ou eritromicina, claritromicina^e e clofazimina</p> <p>Esquema geral para todas as apresentações clínicas (fase de manutenção) Amicacina inalatória, claritromicina^e, clofazimina e moxifloxacina</p>

7 Adaptado de Brasil (2021). CMA = Complexo *M. avium*; CMAB = Complexo *M. abscessus*;

8 TSA = teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

1 ^a A claritromicina deve ser substituída por azitromicina em casos de intolerância ou em caso de
2 fibrose cística;

3 ^b A rifampicina deve ser substituída por rifabutina em pessoas com HIV/AIDS em caso de
4 incompatibilidade com os antirretrovirais.

5 ^c O uso de amicacina inalatória deve ser considerada caso haja dificuldade de administração de
6 medicação injetável.

7 ^d A isoniazida por ser substituída por claritromicina na impossibilidade de sua utilização.

8 ^e No caso de resistência a CLA, o esquema terapêutico deve ser reavaliado.

9

10 No Brasil, estudos corroboram que o sucesso terapêutico de infecções causadas por
11 MNT depende do agente etiológico. Em um estudo conduzido no sul do país, observou-se que
12 pacientes infectados com CMA e *M. kansasii* apresentaram uma taxa de cura de 60,7% e 73,3%,
13 respectivamente. Quanto à infecção por CMAB, o tratamento é complexo e muitas vezes a cura
14 da doença não pode ser atingida, sendo a melhora clínica um resultado suficientemente
15 satisfatório. Dessa forma, no mesmo estudo, cerca de 70% dos casos de doença pulmonar por
16 CMAB apresentaram estabilidade da doença (CARNEIRO et al., 2018). Resultado semelhante
17 foi observado por Monteiro et al. (2018), cujo estudo apontou que, a doença pulmonar causada
18 pelo CMAB possui menor chance de sucesso terapêutico, maior chance de se ter que realizar
19 mudanças no esquema de antimicrobianos utilizados e maior chance de recorrência da infecção,
20 quando comparada a doença pulmonar ocasionada por outras espécies de MNT (MONTEIRO
21 et al., 2018).

22

23 **2.5. Resistência aos antimicrobianos**

24

25 A complexidade do tratamento das infecções causadas pelas MNT está intimamente
26 relacionada à resistência aos antimicrobianos. A parede celular micobacteriana rica em lipídios
27 têm um importante papel na resistência intrínseca desses microrganismos aos antimicrobianos,
28 uma vez que proporciona impermeabilidade (NASIRI et al., 2017; SAXENA; SPAINK; FORN-
29 CUNÍ, 2021). Esta parede celular, além de garantir proteção contra compostos hidrofílicos,
30 também assume um importante papel na patogênese e sobrevivência desses organismos. Dessa
31 forma, proteínas responsáveis pela síntese e manutenção da parede celular micobacteriana
32 acabam sendo importantes alvos para antimicrobianos (ABRAHAMS; BESRA, 2016).

33 Outro componente importante da resistência intrínseca aos antimicrobianos são as
34 bombas de efluxo. As bombas de efluxo são proteínas transmembranas que atuam expelindo

1 moléculas dos antimicrobianos do interior da célula micobacteriana, mantendo-as em
2 concentrações subinibitórias, diminuindo a sua eficácia clínica (NASIRI et al., 2017; RINDI,
3 2020). Diversas bombas de efluxo já foram identificadas em micobactérias (NASIRI et al.,
4 2017; RINDI, 2020). Em cepas do CMA e CMAB, por exemplo, a resistência a azitromicina e
5 claritromicina pode ser conferida através de transportadoras das famílias ABC e MFS (GUO et
6 al., 2020; MACHADO et al., 2015; SCHMALSTIEG et al., 2012; VIANNA et al., 2019), e aos
7 antimicrobianos bedaquilina e clofazimina através de transportadoras da família RND
8 (ALEXANDER et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2019), por meio da superexpressão de genes.
9 Nesse sentido, diversos compostos vêm sendo testados *in vitro* como possíveis inibidores de
10 bombas de efluxo, sendo promissores para atuarem como adjuvantes ao tratamento das
11 micobacterioses, aumentando a eficácia dos antimicrobianos disponíveis (MARTIN et al.,
12 2020; MENICHINI; LARI; RINDI, 2020; VIANNA et al., 2019).

13 A resistência intrínseca também pode ser alcançada pela modificação do
14 antimicrobiano, bem como alterações no seu sítio de ação. Cepas do CMAB, por exemplo,
15 possuem o gene *erm*, intimamente ligado à resistência intrínseca à claritromicina, eritromicina
16 e cetolídeos. O *erm(41)* é um gene induzível que codifica para uma metilase que atua em
17 nucleotídeos do 23S rRNA, inibindo a ligação dos macrolídeos. Cabe ressaltar que o gene
18 *erm(41)* presente em *M. abscessus* subsp. *massiliense* é menor que o gene das outras
19 subespécies devido a deleção de 276 pb, gerando uma metilase não funcional. Portanto,
20 resistência induzida a claritromicina mediada pelo gene *erm(41)*, observada em isolados de *M.*
21 *abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* expostos a esse antimicrobiano por
22 período prolongado, não ocorre em *M. abscessus* subsp. *massiliense* (KIM et al., 2010; NASH;
23 BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2009).

24 Dessa forma, a presença de *erm(41)* funcional em isolados do CMAB contribui para a
25 falta de eficácia dos tratamentos à base de macrolídeos. No entanto, cabe ressaltar que existem
26 isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e de *M. abscessus* subsp. *bolletii* em que a resistência
27 induzida a claritromicina não é observada. Isso ocorre devido uma mutação pontual no gene
28 *erm(41)*: a transição de T para C na posição 28 (T28→C) está relacionada à perda da
29 funcionalidade da metilase produzida (KIM et al., 2010; NASH; BROWN-ELLIOTT;
30 WALLACE, 2009).

31 Além disso, mutações pontuais espontâneas em genes que codificam alvos dos
32 antimicrobianos, causando alteração na sua estrutura e no sítio de ligação com o antimicrobiano,
33 podem conferir resistência adquirida. Em diversos isolados de MNT, a resistência adquirida a
34 macrolídeos está relacionada a uma mutação nas posições 2058 ou 2059 do gene *rrl*, que

1 codifica o 23S rRNA, inclusive em isolados de CMA, CMAB e *M. kansasii* (BASTIAN et al.,
2 2010; BURMAN et al., 1998; MEIER et al., 1994; MEIER et al., 1996;). Em relação aos
3 aminoglicosídeos, importantes para o tratamento de CMA e CMAB, a resistência pode ser
4 adquirida através de mutação pontual do gene *rrs*, que codifica o 16S rRNA. Essas mutações já
5 foram encontradas em isolados de CMAB (posições 1406, 1408, 1409, 1491 ou 1498) e CMA
6 (posições 1408, 1491 ou 1496) (BROWN-ELLIOTT et al., 2013; KIM et al., 2021b; NESSAR
7 et al., 2011; PRAMMANANAN et al., 1998).

8 Mutações adquiridas relacionadas a resistência a rifampicina, antimicrobiano usado no
9 tratamento de *M. kansasii* e CMA, ocorrem principalmente por mutações no gene *rpoB*
10 semelhantes às encontradas em CMTB, mais especificamente na região RRDR (de *rifampicin*
11 *resistance-determining region*) (HUH et al., 2019b). Mutações nos códons 513, 526 e 531 já
12 foram reportados para isolados de *M. kansasii* (KLEIN; BROWN; FRENCH, 2001), sendo a
13 mutação do códon 531 também já encontrada em isolados de *M. avium* (WILLIAMS et al.,
14 1994). No entanto, cepas sem mutações na região RRDR com resistência fenotípica a
15 rifampicina já foram relatadas, e isso reforça a necessidade de considerar outros mecanismos
16 de resistência (OBATA et al., 2006) e estudar outras regiões do gene *rpoB* (HUH et al., 2019b).

17

18 **2.6. Identificação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**

19

20 Sabendo que as diferentes espécies e subespécies de MNT podem variar quanto ao perfil
21 de suscetibilidade aos antimicrobianos, a sua determinação é fundamental para a
22 implementação do tratamento adequado (AONO et al., 2019; GRIFFITH et al., 2007).
23 Atualmente, métodos moleculares já vêm sendo empregados para a detecção de resistência em
24 MNT de importância clínica, como LPA, ensaios de PCR e sequenciamento de genes (AONO
25 et al., 2019; HUH et al., 2019a; KIM et al., 2010). Embora a detecção molecular de resistência
26 seja utilizada, TSA fenotípicos permanecem como referência, pois ainda existem lacunas nas
27 informações referentes a genes e mutações relacionados à resistência fenotípica. Dessa forma,
28 recomenda-se o uso de métodos moleculares como forma de triagem inicial (FORBES et al.,
29 2018).

30 Neste cenário, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) preconiza a
31 realização de ensaios de microdiluição em caldo em isolados clinicamente significativos (isto
32 é, isolados que atendem aos critérios da ATS/IDSA para serem considerados causadores de
33 doença) (CLSI, 2018). Nesse método, são feitas diluições seriadas (de 2 vezes) do
34 antimicrobiano no meio de cultivo líquido em placas de 96 poços, possibilitando a determinação

1 da concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração do
2 antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de mais de 99% dos microrganismos. A partir do
3 valor da CIM, o perfil dos isolados frente ao antimicrobiano testado é classificado como
4 sensível, intermediário ou resistente, se baseando em pontos de corte previamente determinados
5 (BROWN-ELLIOTT; WOODS, 2019; CLSI, 2018).

6 O ensaio de microdiluição seriada é realizado a partir de isolados clínicos, e os
7 resultados podem ser lidos entre o 7^o e 14^o dia de ensaio para SGM e entre o 3^o e o 5^o dia de
8 ensaio para RGM, exceto quando se busca determinar o perfil de suscetibilidade a macrolídeos
9 em cepas do CMAB. Nesse caso, devido a possibilidade de indução de resistência mediada pelo
10 gene *erm(41)* em *M. abscessus* subsp. *abscessus* e em *M. abscessus* subsp. *bolletii*, para cepas
11 que se mostram sensíveis à claritromicina na leitura inicial dos resultados, o ensaio é
12 prolongado por até 14 dias (BROWN-ELLIOTT; WOODS, 2019; CLSI, 2018).

13 Como vantagem, os ensaios de microdiluição em microplacas permitem a testagem de
14 vários isolados e antimicrobianos simultaneamente (LEE et al., 2007). Dessa forma, nos últimos
15 anos, ensaios comerciais baseados em microdiluição foram desenvolvidos, como o Sensititre™
16 SLOMYCO e o Sensititre™ RAPMYCO (Trek Diagnostic Systems Ltd, Reino Unido), e vem
17 sendo utilizados para identificar o perfil aos antimicrobianos frente a cepas de MNT SGM e
18 RGM, respectivamente. Tratam-se de ensaios promissores para serem implementados na rotina
19 diagnóstica, porém mais estudos avaliando-os são necessários (BABADY et al., 2010;
20 CARVALHO et al., 2021; CAVUSOGLU; GURPINAR; ECEMIS, 2012; CHAZEL et al.,
21 2016; LITVINOV et al., 2018).

22 A leitura dos resultados dos ensaios de microdiluição em caldo gerados pelo teste *in-*
23 *house* preconizado pelo CLSI e pelos testes comerciais apresentam limitações. Pelo método *in-*
24 *house*, a leitura dos resultados é realizada através da visualização da turbidez gerada pelo
25 crescimento bacteriano (com ou sem auxílio de espectrofotômetro) (CLSI, 2018), porém
26 algumas cepas podem não formar grumos bem definidos no fundo dos poços, tornando a
27 interpretação da CIM difícil e mais propensa a erros (LEE et al., 2007). Já nos ensaios
28 comerciais, a leitura dos resultados pode ser realizada semelhantemente a olho nu (CHAZEL
29 et al., 2016) ou de forma automatizada, sendo necessário um equipamento adicional
30 (Sensititre™ Vizion™) (LITVINOV et al., 2018). Dessa forma, o uso de indicadores
31 colorimétricos de viabilidade celular vem sendo introduzido nestes ensaios como forma de
32 simplificar e otimizar a visualização dos resultados (CARVALHO et al., 2021; PARK et al.,
33 2009; RAMIS et al., 2015; SHARMA et al., 2021).

1 Apesar de diversos indicadores colorimétricos de viabilidade celular estarem
2 disponíveis para uso *in vitro*, os TSA colorimétricos padronizados para micobactérias são
3 majoritariamente voltados para o CMTB, principalmente para a detecção de cepas
4 multirresistentes (KONTSEVAYA et al., 2019; MARTIN; PORTAELS; PALOMINO, 2007).
5 Alguns destes indicadores acabam sendo adaptados para as MNT, e nesse cenário, a resazurina
6 é o mais utilizado para TSA com isolados de MNT, seguida dos sais de tetrazólio. O uso de
7 ambos indicadores é baseado em uma reação de oxirredução na presença de células
8 metabolicamente ativas. Essa reação gera mudança de coloração do meio (de azul para rosa,
9 para a resazurina, e de transparente para roxo ou vermelho, para sais de tetrazólio), sendo essa
10 mudança proporcional ao crescimento bacteriano (GOMEZ-FLORES et al., 1995; OMS, 2015;
11 RAMIS et al., 2015).

12 Para as MNT, ensaio de microdiluição seriada em caldo utilizando resazurina, mais
13 conhecido como REMA (de *Resazurin Microtiter Assay*), foi inicialmente padronizado para
14 identificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento frente a
15 cepas do CMA, do CMAB, e de outras RGM, apresentando elevada concordância com o
16 método preconizado pelo CLSI (CASTILHO et al., 2015; JADAUN et al., 2007; RAMIS et al.,
17 2015). A partir disto, o REMA, além de permanecer sendo usado para esse propósito
18 (CARVALHO et al., 2021; SHARMA; MALHOTRA; KHANDELWAL, 2021), tem sido
19 amplamente utilizado para a avaliação da atividade de novos compostos como antimicrobianos
20 ou inibidores de bombas de efluxo em cepas de diferentes espécies de MNT (AGUILAR-
21 AYALA et al., 2017; MARTIN et al., 2019; MARTIN et al., 2020; PORTELL-BUJ et al.,
22 2019).

23 Em relação aos sais de tetrazólio, quatro destes já foram utilizados para TSA baseados
24 em microdiluição em caldo em isolados de MNT: o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-
25 difenil tetrazólio (MTT) (GOMEZ-FLORES et al., 1995; VIANNA et al., 2019), o cloreto de
26 2,3-difenil-5-tienil-(2)-tetrazólio (STC) (LEE et al., 2007; PARK et al., 2009), o 2,3-bis(2-
27 metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) e o sal de sódio de 2-(4-
28 iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio (WST-1) (TSUKATANI et al.,
29 2015). No entanto, para o WST-1 e o XTT, o único estudo propõe a leitura dos resultados
30 somente através de um leitor de microplacas (TSUKATANI et al., 2015).

31 Os sais de tetrazólio podem ser solúveis ou insolúveis em água. Diferentemente do
32 WST-1 e do XTT, o MTT e o STC são sais insolúveis em água, portanto, formam precipitados
33 escuros quando reduzidos. Dessa forma, o uso desses indicadores geralmente está associado a
34 agentes solubilizantes, como o dodecil sulfato de sódio, para que a coloração avermelhada seja

1 dissipada homoganeamente nos poços e seja visualizada (GOMEZ-FLORES et al., 1995; LEE
2 et al., 2007). De modo geral, o uso dos indicadores colorimétricos (resazurina, MTT e STC)
3 apresenta elevada concordância com o ensaio de microdiluição em caldo utilizando a leitura
4 visual da turbidez.

5 Além dos TSA colorimétricos já padronizados para MNT, alguns indicadores utilizados
6 para ensaios com CMTB podem ser promissores para estas micobactérias. Entre estes está o
7 cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio, um sal de tetrazólio que é reduzido a formazan vermelho e
8 insolúvel em água na presença de células metabolicamente ativas. Para micobactérias, o TTC
9 foi previamente proposto em TSA para CMTB e possibilitou a detecção de resistência a
10 isoniazida e rifampicina (MOHAMMADZADEH et al., 2006; SHINU et al., 2016). Dessa
11 forma, a avaliação desse sal de tetrazólio em TSA frente a cepas de MNT será abordada na
12 presente dissertação.

1 3. OBJETIVOS

2

3 3.1. Objetivo geral

4

5 Avaliar o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) como indicador colorimétrico de viabilidade
6 celular para a determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em cepas de MNT.

7

8 3.2. Objetivos específicos

9

- 10 ● Padronizar um TSA utilizando o TTC como indicador colorimétrico frente a cepas de
11 referência de CMAB, CMA e *M. kansasii*;
- 12 ● Avaliar o TSA utilizando o TTC como indicador colorimétrico frente a isolados clínicos
13 do CMAB, CMA e *M. kansasii*, utilizando a leitura visual da turbidez como padrão-ouro;
- 14 ● Avaliar o TSA utilizando o TTC como indicador colorimétrico para a detecção de
15 resistência induzida a claritromicina em isolados clínicos do CMAB, utilizando a leitura
16 visual da turbidez como padrão-ouro.

4. BIBLIOGRAFIA

ABRAHAMS, K. A.; BESRA, G. S. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. **Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 116–133, 15 dez. 2016.

AFSAR, I. et al. Comparison of culture, microscopic smear and molecular methods in diagnosis of tuberculosis. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 31, n. 5, 2018.

AGUILAR-AYALA, D. A. et al. In vitro activity of bedaquiline against rapidly growing nontuberculous mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 1140–1143, 1 ago. 2017.

AHMAD, S.; MOKADDAS, E. Diversity of Nontuberculous Mycobacteria in Kuwait: Rapid Identification and Differentiation of *Mycobacterium* Species by Multiplex PCR, INNO-LiPA Mycobacteria v2 Assay and PCR Sequencing of rDNA. **Medical Principles and Practice**, v. 28, n. 3, p. 208–215, 2019.

ALEXANDER, D. C. et al. Emergence of mmpT5 Variants during Bedaquiline Treatment of *Mycobacterium intracellulare* Lung Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 574–584, fev. 2017.

ANVISA. **Comunicado de Risco 002/2014 Infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) relacionadas a procedimentos invasivos em serviços de saúde e clínicas cosméticas, no período de Janeiro de 2010 a setembro de 2014**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1>>. Acesso em: 8 jan. 2022.

AONO, A. et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *abscessus* complex, *Mycobacterium* (*Mycobacterium*) *fortuitum*, and *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *chelonae*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 2, p. 117–123, fev. 2019.

APPAK, Ö. et al. Comparison of polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis method and DNA sequence analysis results in the identification of non-tuberculous mycobacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 65, n. 4, p. 515–527, 14 jul. 2018.

ARORA, D.; DHANASHREE, B. Utility of smear microscopy and GeneXpert for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **GERMS**, v. 10, n. 2, p. 81–87, jun. 2020.

BABADY, N. E. et al. Evaluation of *Mycobacterium avium* Complex Clarithromycin Susceptibility Testing Using SLOMYCO Sensititre Panels and Just One Strips. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1749–1752, maio 2010.

BAKUŁA, Z. et al. Drug Susceptibility Profiling and Genetic Determinants of Drug Resistance in *Mycobacterium kansasii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, abr. 2018.

- 1 BALDWIN, S. L. et al. The complexities and challenges of preventing and treating
2 nontuberculous mycobacterial diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p.
3 e0007083, 14 fev. 2019.
- 4
5 BASTIAN, S. et al. Assessment of Clarithromycin Susceptibility in Strains Belonging to the
6 *Mycobacterium abscessus* Group by *erm*(41) and *rml* Sequencing. **Antimicrobial Agents and**
7 **Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 775–781, 6 dez. 2010.
- 8
9 BHALLA, G. S. et al. Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria.
10 **Practical Laboratory Medicine**, v. 12, p. e00107, nov. 2018.
- 11
12 BOYLE, D. P. et al. Comparison of Clinical Features, Virulence, and Relapse among
13 *Mycobacterium avium* Complex Species. **American Journal of Respiratory and Critical**
14 **Care Medicine**, v. 191, n. 11, p. 1310–1317, jun. 2015.
- 15
16 BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças
17 de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Recomendações para o**
18 **Diagnóstico e Tratamento das Doenças Causadas por Micobactérias não Tuberculosas**
19 **no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. p. 93
- 20
21 BROWN-ELLIOTT, B. A. et al. In Vitro Activity of Amikacin against Isolates of
22 *Mycobacterium avium* Complex with Proposed MIC Breakpoints and Finding of a 16S rRNA
23 Gene Mutation in Treated Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3389–
24 3394, out. 2013.
- 25
26 BROWN-ELLIOTT, B. A.; WOODS, G. L. Antimycobacterial Susceptibility Testing of
27 Nontuberculous Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 10, out. 2019.
- 28
29 BRYANT, J. M. et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant
30 nontuberculous *Mycobacterium*. **Science**, v. 354, n. 6313, p. 751–757, 11 nov. 2016.
- 31
32 BURMAN, W. J. et al. AIDS-Related *Mycobacterium kansasii* Infection with Initial
33 Resistance to Clarithromycin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, n. 2,
34 p. 369–371, jun. 1998.
- 35
36 BUSATTO, C. et al. Nontuberculous mycobacteria in patients with suspected tuberculosis
37 and the genetic diversity of *Mycobacterium avium* in the extreme south of Brazil. **Jornal**
38 **Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, n. 2, p. e20190184–e20190184, 2020.
- 39
40 CARDOSO, A. M. et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in
41 Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 14-15, p. 1552–1557, nov. 2008.
- 42
43 CARNEIRO, M. S. et al. Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high tuberculosis
44 incidence setting in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 2, p. 106–111, abr.
45 2018.
- 46
47 CARVALHO, N. F. G. et al. Evaluation of drug susceptibility in nontuberculous
48 mycobacteria using the SLOMYCO and RAPMYCO sensititre plates. **International Journal**
49 **of Mycobacteriology**, v. 10, n. 4, p. 379–387, 2021.
- 50

- 1 CASTILHO, A. L. et al. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by
2 resazurin broth microdilution assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 119–
3 121, abr. 2015.
- 4
- 5 CAVUSOGLU, C.; GURPINAR, T.; ECEMIS, T. Evaluation of antimicrobial susceptibilities
6 of rapidly growing mycobacteria by Sensititre RAPMYCO panel. **New Microbiologica**, v.
7 35, n. 1, p. 73–76, 2012.
- 8
- 9 CHAE, H. et al. Development of a One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection
10 of Major *Mycobacterium* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 2736–
11 2751, set. 2017.
- 12
- 13 CHANG, C.-L. et al. Different clinical features of patients with pulmonary disease caused by
14 various *Mycobacterium avium–intracellulare* complex subspecies and antimicrobial
15 susceptibility. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 98, p. 33–40, set. 2020.
- 16
- 17 CHAZEL, M. et al. Evaluation of the SLOMYCO Sensititre® panel for testing the
18 antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium marinum* isolates. **Annals of Clinical
19 Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, 6 maio 2016.
- 20
- 21 CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Susceptibility
22 Testing of Mycobacteria, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes. 3. ed. Wayne:
23 **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2018. p. 110
- 24
- 25 CONTRERAS, S. et al. Identificación de especies de micobacterias mediante espectrometría
26 de masas (MALDI-TOF). **Revista chilena de infectología**, v. 37, n. 3, p. 252–256, jun. 2020.
- 27
- 28 DA COSTA, A. R. F. et al. Occurrence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary
29 Infection in an Endemic Area of Tuberculosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7,
30 p. e2340, 18 jul. 2013.
- 31
- 32 DALEY, C. L. et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an
33 official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. **European Respiratory
34 Journal**, v. 56, n. 1, p. 2000535, jul. 2020.
- 35
- 36 DE CARVALHO, L. D. et al. Drug susceptibility profile of *Mycobacterium kansasii* clinical
37 isolates from Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 19, p. 228–230, dez.
38 2019.
- 39
- 40 DE LIMA, C. A. M. et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients
41 with pulmonary tuberculosis in the state of Rondonia, Brazil. **Memórias do Instituto
42 Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 457–462, jun. 2013.
- 43
- 44 DE LOGU, A. et al. Comparison of Two Rapid Colorimetric Methods for Determining
45 Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin, Isoniazid, and Streptomycin in Liquid
46 Medium. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 1,
47 p. 33–39, 1 fev. 2001.
- 48

- 1 DE MELLO, K. G. C. et al. Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous
2 Mycobacterial Disease, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 3,
3 mar. 2013.
4
- 5 DESIKAN, P. et al. Public health relevance of non-tuberculous mycobacteria among AFB
6 positive sputa. **GERMS**, v. 7, n. 1, p. 10–18, 1 mar. 2017.
7
- 8 FENNELLY, K. P. et al. Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a Lung Cavity.
9 **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 6, p. 692–693, 15
10 mar. 2016.
11
- 12 FERREIRA, G. L. S. et al. Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents.
13 **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 691–696, 1 fev. 2018.
14
- 15 FORBES, B. A. et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories:
16 Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 2, abr. 2018.
17
- 18 GEBERT, M. J. et al. Ecological Analyses of Mycobacteria in Showerhead Biofilms and
19 Their Relevance to Human Health. **mBio**, v. 9, n. 5, 7 nov. 2018.
20
- 21 GOLDENBERG, T. et al. Clinical and epidemiological characteristics of *M. kansasii*
22 pulmonary infections from Rio de Janeiro, Brazil, between 2006 and 2016. **Jornal Brasileiro**
23 **de Pneumologia**, v. 46, n. 6, p. e20190345–e20190345, 2020.
24
- 25 GOMEZ-FLORES, R. et al. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M.*
26 *intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. **Journal of clinical**
27 **microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1842–6, 1995.
28
- 29 GRIFFITH, D. E. et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and
30 Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **American Journal of Respiratory**
31 **and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 4, p. 367–416, 15 fev. 2007.
32
- 33 GRIFFITH, D. E.; DALEY, C. L. Treatment of *Mycobacterium abscessus* Pulmonary
34 Disease. **Chest**, v. 161, n. 1, p. 64–75, jan. 2022.
35
- 36 GUO, Q. et al. Efflux Pumps Contribute to Intrinsic Clarithromycin Resistance in Clinical,
37 *Mycobacterium abscessus* Isolates. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 447–454, fev.
38 2020.
39
- 40 GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly
41 Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and
42 Four Novel Genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 13 fev. 2018.
43
- 44 GUTIÉRREZ, A. V. et al. The TetR Family Transcription Factor MAB_2299c Regulates the
45 Expression of Two Distinct MmpS-MmpL Efflux Pumps Involved in Cross-Resistance to
46 Clofazimine and Bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and**
47 **Chemotherapy**, v. 63, n. 10, out. 2019.
48
- 49 HUH, H. J. et al. GenoType NTM-DR Performance Evaluation for Identification of
50 *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* and Determination of

- 1 Clarithromycin and Amikacin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 8, ago.
2 2019a.
3
- 4 HUH, H. J. et al. Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of
5 drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. **Infection, Genetics and**
6 **Evolution**, v. 72, p. 169–182, ago. 2019b.
7
- 8 JADAUN, G. P. S. et al. Determination of ethambutol MICs for *Mycobacterium tuberculosis*
9 and *Mycobacterium avium* isolates by resazurin microtitre assay. **Journal of Antimicrobial**
10 **Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 152–155, 4 maio 2007.
11
- 12 JEON, D. Infection Source and Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Lung
13 Disease. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 82, n. 2, p. 94, 2019.
14
- 15 KAKHKI, R. K. et al. Development of a Cost-Effective Line Probe Assay for Rapid
16 Detection and Differentiation of *Mycobacterium* Species: A Pilot Study. **Reports of**
17 **biochemistry & molecular biology**, v. 8, n. 4, 2020.
18
- 19 KAKIMOTO, Y. et al. The Effectiveness and Limitations of Triphenyltetrazolium Chloride to
20 Detect Acute Myocardial Infarction at Forensic Autopsy. **American Journal of Forensic**
21 **Medicine & Pathology**, v. 34, n. 3, p. 242–247, set. 2013.
22
- 23 KANG, N. et al. Outcomes of Inhaled Amikacin-Containing Multidrug Regimens for
24 *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease. **Chest**, v. 160, n. 2, p. 436–445, ago. 2021.
25
- 26 KHAN, O.; CHAUDARY, N. The Use of Amikacin Liposome Inhalation Suspension
27 (Arikayce) in the Treatment of Refractory Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in
28 Adults. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 14, p. 2287–2294, jun. 2020.
29
- 30 KIM, H.-Y. et al. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus*
31 and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (erm) and
32 clarithromycin susceptibility patterns. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 6, p. 347–
33 353, 8 mar. 2010.
34
- 35 KIM, S. H.; SHIN, J. H. Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates
36 and Specimens using AdvanSure Mycobacteria GenoBlot Assay. **Japanese Journal of**
37 **Infectious Diseases**, v. 73, n. 4, p. 278–281, 31 jul. 2020.
38
- 39 KIM, M.-J. et al. Identification of Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Pulmonary
40 Diseases in Gyeongnam, Korea, Using Multiplex PCR and Multigene Sequence-Based
41 Analysis. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2021, p.
42 1–13, 22 fev. 2021a.
43
- 44 KIM, S.-Y. et al. Association between 16S rRNA gene mutations and susceptibility to
45 amikacin in *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* clinical isolates.
46 **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 17 mar. 2021b.
47
- 48 KLEIN, J. L.; BROWN, T. J.; FRENCH, G. L. Rifampin Resistance in *Mycobacterium*
49 *kansasii* Is Associated with rpoB Mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.
50 45, n. 11, p. 3056–3058, nov. 2001.

- 1
2 KOH, W.-J. et al. Clinical Significance of the Differentiation Between *Mycobacterium avium*
3 and *Mycobacterium intracellulare* in *M. avium* Complex Lung Disease. **Chest**, v. 142, n. 6, p.
4 1482–1488, dez. 2012.
- 5
6 KONTSEVAYA, I. et al. Non-commercial phenotypic assays for the detection of
7 *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance: a systematic review. **European Journal of**
8 **Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 415–426, 30 out. 2019.
- 9
10 KWAK, N. et al. *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease: individual patient data meta-
11 analysis. **European Respiratory Journal**, v. 54, n. 1, p. 1801991, 17 mar. 2019.
- 12
13 KWIECIŃSKA-PIRÓG, J. et al. The Assessment of *Proteus mirabilis* Susceptibility to
14 Ceftazidime and Ciprofloxacin and the Impact of These Antibiotics at Subinhibitory
15 Concentrations on *Proteus mirabilis* Biofilms. **BioMed Research International**, v. 2013, p.
16 1–8, 2013.
- 17
18 LEE, S. M. et al. Evaluation of the Broth Microdilution Method Using 2,3-Diphenyl-5-
19 thienyl-(2)-tetrazolium Chloride for Rapidly Growing Mycobacteria Susceptibility Testing.
20 **Journal of Korean Medical Science**, v. 22, n. 5, p. 784–790, 2007.
- 21
22 LI, L.; YU, Q.; LIANG, W. Use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-stained brain tissues
23 for immunofluorescence analyses after focal cerebral ischemia in rats. **Pathology - Research**
24 **and Practice**, v. 214, n. 1, p. 174–179, jan. 2018.
- 25
26 LI, B. et al. Glycopeptidolipid Genotype Correlates With the Severity of *Mycobacterium*
27 *abscessus* Lung Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. Supplement_2, p.
28 S257–S262, 16 mar. 2020.
- 29
30 LITVINOV, V. et al. Drug susceptibility testing of slowly growing non-tuberculous
31 mycobacteria using slomyco test-system. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203108, 17 set. 2018.
- 32
33 LIU, H. et al. Identification of Species of Nontuberculous Mycobacteria Clinical Isolates from
34 8 Provinces of China. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- 35
36 MACHADO, D. et al. Boosting Effect of 2-Phenylquinoline Efflux Inhibitors in Combination
37 with Macrolides against *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*. **ACS**
38 **Infectious Diseases**, v. 1, n. 12, p. 593–603, 23 jul. 2015.
- 39
40 MARQUES, L. R. M.; FERRAZOLI, L.; CHIMARA, É. Pulmonary nontuberculous
41 mycobacterial infections: presumptive diagnosis based on the international microbiological
42 criteria adopted in the state of São Paulo, Brazil, 2011-2014. **Jornal Brasileiro de**
43 **Pneumologia**, v. 45, n. 2, 2019.
- 44
45 MARTIN, A.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Colorimetric redox-indicator methods for
46 the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic
47 review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 175–183,
48 2007.
- 49

- 1 MARTIN, A. et al. In vitro activity of bedaquiline against slow-growing nontuberculous
2 mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 1137–1139, 1 ago. 2019.
- 3
- 4 MARTIN, A. et al. Targeting bedaquiline mycobacterial efflux pump to potentially enhance
5 therapy in *Mycobacterium abscessus*. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 9, n. 1,
6 p. 71, 2020.
- 7
- 8 MATOS, E. D. et al. Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference
9 center in Bahia: clinical epidemiological aspects. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**,
10 v. 8, n. 4, p. 296–304, ago. 2004.
- 11
- 12 MAUCH, R. M. et al. Nontuberculous mycobacterial infections in a Brazilian pediatric
13 population: a seven-year survey. **Pathogens and Global Health**, v. 114, n. 2, p. 104–108, 8
14 fev. 2020.
- 15
- 16 MEEHAN, C. J. et al. Reconstituting the genus *Mycobacterium*. **International Journal of**
17 **Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 9, 23 set. 2021.
- 18
- 19 MEIER, A. et al. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant
20 *Mycobacterium intracellulare*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 2, p.
21 381–384, fev. 1994.
- 22
- 23 MEIER, A. et al. Molecular Mechanisms of Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium*
24 *avium*: Observation of Multiple 238 rDNA Mutations in a Clonal Population. **Journal of**
25 **Infectious Diseases**, v. 174, n. 2, p. 354–360, 1 ago. 1996.
- 26
- 27 MENICHINI, M.; LARI, N.; RINDI, L. Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility
28 of *Mycobacterium avium* complex to clarithromycin. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 2,
29 p. 128–132, 2020.
- 30
- 31 MOHAMMADZADEH, A. et al. Rapid and low-cost colorimetric method using 2,3,5-
32 triphenyltetrazolium chloride for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium*
33 *tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1657–1659, 1 dez. 2006.
- 34
- 35 MONTEIRO, J. T. C. et al. Clinical aspects in patients with pulmonary infection caused by
36 mycobacteria of the *Mycobacterium abscessus* complex, in the Brazilian Amazon. **Jornal**
37 **Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 2, p. 93–98, abr. 2018.
- 38
- 39 MOTA, M. A. DE L. et al. Clinical-epidemiological profile and factors related to the
40 mortality of patients with nontuberculous mycobacteria isolated at a reference hospital in
41 Ceará, Northeastern Brazil. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 9, n. 1, p. 83,
42 2020.
- 43
- 44 MUKHERJEE, R.; CHATTERJI, D. Glycopeptidolipids: Immuno-modulators in greasy
45 mycobacterial cell envelope. **IUBMB Life**, v. 64, n. 3, p. 215–225, 18 jan. 2012.
- 46
- 47 NASH, K. A.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. A Novel Gene, erm (41),
48 Confers Inducible Macrolide Resistance to Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus* but
49 Is Absent from *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53,
50 n. 4, p. 1367–1376, abr. 2009.

- 1
2 NASIRI, M. J. et al. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance
3 Mechanisms in Mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 25 abr. 2017.
4
- 5 NASIRI, M. J. et al. Antibiotic therapy success rate in pulmonary *Mycobacterium avium*
6 complex: a systematic review and meta-analysis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**,
7 v. 18, n. 3, p. 263–273, 27 jan. 2020.
8
- 9 NESSAR, R. et al. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside
10 resistance in *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n.
11 8, p. 1719–1724, 7 jun. 2011.
12
- 13 NEUSCHLOVA, M. et al. Identification of *Mycobacterium* Species by MALDI-TOF Mass
14 Spectrometry. **Pulmonary Care and Clinical Medicine**, v. 1021, p. 37–42, 2017.
15
- 16 NIÑO-PADILLA, E. I.; VELAZQUEZ, C.; GARIBAY-ESCOBAR, A. Mycobacterial
17 biofilms as players in human infections: a review. **Biofouling**, v. 37, n. 4, p. 410–432, 21 abr.
18 2021.
19
- 20 NISHIMURA, T. et al. The rough colony morphotype of *Mycobacterium avium* exhibits high
21 virulence in human macrophages and mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 7, p.
22 1020–1033, 1 jul. 2020.
23
- 24 NUNES, L. DE S. et al. Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in
25 southern Brazil: persistence of a single clone from 2007 to 2011. **Journal of Medical**
26 **Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 1288–1293, 1 out. 2014.
27
- 28 OBATA, S. et al. Association of rpoB mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium*
29 *avium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 1, p. 32–39, jan. 2006.
30
- 31 OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **Implementing tuberculosis**
32 **diagnostics: policy framework**. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2015. p. 39
33
- 34 OREN, A.; GARRITY, G. M. List of new names and new combinations previously
35 effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and**
36 **Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 3379–3393, 1 nov. 2018.
37
- 38 PARK, Y. K. et al. Clarithromycin Susceptibility Testing of *Mycobacterium avium* Complex
39 Using 2,3-Diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium Chloride Microplate Assay with Middlebrook
40 7H9 Broth. **Journal of Korean Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 511–512, 2009.
41
- 42 PARK, Y. et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with macrolide-
43 resistant *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease: a systematic review and meta-
44 analysis. **Respiratory Research**, v. 20, n. 1, dez. 2019.
45
- 46 PARTE, A. C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves
47 to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70,
48 n. 11, p. 5607–5612, 1 nov. 2020.
49

- 1 PASIPANODYA, J. G. et al. Systematic Review and Meta-analyses of the Effect of
2 Chemotherapy on Pulmonary *Mycobacterium abscessus* Outcomes and Disease Recurrence.
3 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, nov. 2017.
4
- 5 PEDRO, H. P. et al. Epidemiological and laboratorial profile of patients with isolation of
6 nontuberculous mycobacteria. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 6, n. 3, p.
7 239, 2017.
8
- 9 PEREIRA, A. C. et al. Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of
10 Virulence and Adaptation to Ecological Niches. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1380, 9 set.
11 2020.
12
- 13 PINHEIRO, P. Y. M.; SETÚBAL, S.; OLIVEIRA, S. A. DE. Post-surgical atypical
14 mycobacteriosis in 125 patients in Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de**
15 **Medicina Tropical**, v. 52, 2019.
16
- 17 PORTELL-BUJ, E. et al. In vitro activity of 12 antimicrobial peptides against *Mycobacterium*
18 *tuberculosis* and *Mycobacterium avium* clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**,
19 v. 68, n. 2, p. 211–215, 1 fev. 2019.
20
- 21 PRAMMANANAN, T. et al. A Single 16S Ribosomal RNA Substitution Is Responsible for
22 Resistance to Amikacin and Other 2-Deoxystreptamine Aminoglycosides in *Mycobacterium*
23 *abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 6, p.
24 1573–1581, jun. 1998.
25
- 26 PROCOP, G. W. HIV and mycobacteria. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 34, n. 4, p.
27 332–339, jul. 2017.
28
- 29 QVIST, T. et al. Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a
30 biofilm infection. **European Respiratory Journal**, v. 46, n. 6, p. 1823–1826, 22 out. 2015.
31
- 32 RAMIS, I. B. et al. Antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria using the
33 rapid colorimetric method. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**
34 **Diseases**, v. 34, n. 7, p. 1403–1413, 29 mar. 2015.
35
- 36 RINDI, L. Efflux Pump Inhibitors against Nontuberculous Mycobacteria. **International**
37 **Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4191, 12 jun. 2020.
38
- 39 RIVERO-LEZCANO, O.; GONZÁLEZ-CORTÉS, C.; MIRSAEIDI, M. The unexplained
40 increase of nontuberculous mycobacteriosis. **International Journal of Mycobacteriology**, v.
41 8, n. 1, p. 1, 2019.
42
- 43 RUNYON, E. H. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. **Medical Clinics of**
44 **North America**, v. 43, n. 1, p. 273–290, jan. 1959.
45
- 46 SANTIN, M. et al. Pulmonary Infections with Nontuberculous Mycobacteria, Catalonia,
47 Spain, 1994–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1091–1094, jun. 2018.
48

- 1 SANTOS, R. et al. Extraordinary solute-stress tolerance contributes to the environmental
2 tenacity of mycobacteria. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 5, p. 746–764, 29
3 jul. 2015.
- 4
- 5 SAXENA, S.; SPAINK, H. P.; FORN-CUNÍ, G. Drug Resistance in Nontuberculous
6 Mycobacteria: Mechanisms and Models. **Biology**, v. 10, n. 2, p. 96, 29 jan. 2021.
- 7
- 8 SCHMALSTIEG, A. M. et al. The Antibiotic Resistance Arrow of Time: Efflux Pump
9 Induction Is a General First Step in the Evolution of Mycobacterial Drug Resistance.
10 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4806–4815, 2 jul. 2012.
- 11
- 12 SEBASTIAN, G. et al. “Identification of Non-Tuberculous *Mycobacterium* by LPA (CM/AS)
13 assay, HPLC and biochemical test: which is feasible for RNTCP?”. **Indian Journal of
14 Tuberculosis**, v. 65, n. 4, p. 329–334, out. 2018.
- 15
- 16 SHARMA, S.; UPADHYAY, V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous
17 mycobacterial diseases. **Indian Journal of Medical Research**, v. 152, n. 3, p. 185, 2020.
- 18
- 19 SHARMA, M.; MALHOTRA, B.; KHANDELWAL, S. Drug susceptibility testing of
20 nontuberculous mycobacteria by broth microdilution method. **Indian Journal of Medical
21 Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 306–310, jul. 2021.
- 22
- 23 SHINU, P.; SINGH, V.; NAIR, A. Isoniazid and rifampin drug susceptibility testing:
24 application of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride assay and microscopic-observation drug-
25 susceptibility assay directly on Ziehl-Neelsen smear positive sputum specimens. **The
26 Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 33–40, jan. 2016.
- 27
- 28 SINGH, K. et al. Detection of clinically important non tuberculous mycobacteria (NTM) from
29 pulmonary samples through one-step multiplex PCR assay. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1,
30 26 ago. 2020.
- 31
- 32 SUBEDI, S. et al. 16S-23S Internal Transcribed Spacer Region PCR and Sequencer-Based
33 Capillary Gel Electrophoresis has Potential as an Alternative to High Performance Liquid
34 Chromatography for Identification of Slowly Growing Nontuberculous Mycobacteria. **PLOS
35 ONE**, v. 11, n. 10, p. e0164138, 17 out. 2016.
- 36
- 37 TELENTI, A. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase
38 chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 2,
39 p. 175–8, 1993.
- 40
- 41 THIERRY, D. et al. Isolation of specific DNA fragments of *Mycobacterium avium* and their
42 possible use in diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1048–54, 1993.
- 43
- 44 TONEY, N. C.; TONEY, S. R.; BUTLER, W. R. Utility of high-performance liquid
45 chromatography analysis of mycolic acids and partial 16S rRNA gene sequencing for routine
46 identification of *Mycobacterium* spp. in a national reference laboratory. **Diagnostic
47 Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 2, p. 143–152, jun. 2010.
- 48
- 49 TORTOLI, E. et al. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium
50 abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of

- 1 *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. **International Journal of**
2 **Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4471–4479, 1 nov. 2016.
3
- 4 TRAN, T. et al. A paucity of knowledge regarding nontuberculous mycobacterial lipids
5 compared to the tubercle bacillus. **Tuberculosis**, v. 115, p. 96–107, mar. 2019.
6
- 7 TSUKATANI, T. et al. Rapid susceptibility testing for slowly growing nontuberculous
8 mycobacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-
9 soluble tetrazolium WST-1. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**
10 **Diseases**, v. 34, n. 10, p. 1965–1973, 15 jul. 2015.
11
- 12 TURENNE, C. Y. Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution.
13 **Infection, Genetics and Evolution**, v. 72, p. 159–168, ago. 2019.
14
- 15 VAN INGEN, J. et al. A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and
16 clinical purposes, a review. **International Journal of Systematic and Evolutionary**
17 **Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 3666–3677, 1 nov. 2018.
18
- 19 VIANNA, J. S. et al. The Contribution of Efflux Pumps in *Mycobacterium abscessus*
20 Complex Resistance to Clarithromycin. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 153, 18 set. 2019.
21
- 22 WILLIAMS, D. L. et al. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria.
23 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 10, p. 2380–2386, out. 1994.
24
- 25 ZHANG, J. et al. Amikacin Liposome Inhalation Suspension (ALIS) Penetrates Non-
26 tuberculous Mycobacterial Biofilms and Enhances Amikacin Uptake Into Macrophages.
27 **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 16 maio 2018.
28
- 29 ZWEIJPFENNING, S.; HOEFSLOOT, W.; INGEN, J. Geographic Distribution of
30 Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Clinical Specimens: A Systematic Review.
31 **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 39, n. 03, p. 336–342, jun. 2018.

1 **5. MANUSCRITO**

2

3 Manuscrito a ser submetido ao *Journal of Microbiological Methods* (Fator de impacto
4 2,363). As normas de submissão podem ser consultadas em:
5 <[https://www.elsevier.com/journals/journal-of-microbiological-methods/0167-7012/guide-](https://www.elsevier.com/journals/journal-of-microbiological-methods/0167-7012/guide-for-authors)
6 [for-authors](https://www.elsevier.com/journals/journal-of-microbiological-methods/0167-7012/guide-for-authors)>.

**2,3,5-TRIPHENYL TETRAZOLIUM CHLORIDE AS COLORIMETRIC
INDICATOR FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING AGAINST
RAPIDLY AND SLOWLY GROWING NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA**

Mariana Quaresma de Souza^a, Dienefer Venske Bierhals^a, Ana Julia Reis^a, Andrea von Groll^a,
Pedro Eduardo Almeida da Silva^a, Ivy Bastos Ramis^a

^aLaboratório de Micobactérias, Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Corresponding author:

Mariana Quaresma de Souza - mari.quaresma@hotmail.com

Laboratório de Micobactérias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande,
Rua General Osório, s/n, Centro, CEP 96200-400, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Highlights:

- TTC is a promising tetrazolium salt to be used as a colorimetric indicator;
- TTC assay is able to identify antimicrobial resistance in nontuberculous mycobacteria;
- TTC assay allows an easier, more reliable and safer reading of results.

ABSTRACT

Infections caused by nontuberculous mycobacteria (NTM) are being increasingly reported and are complex to treat. In this context, the identification of the antimicrobial susceptibility profile of NTM strains is essential for the adoption of the correct treatment. Thus, the aim of the present study was to propose and evaluate an antimicrobial susceptibility testing (AST) using the 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) as a colorimetric indicator against *Mycobacterium abscessus* complex (MABC), *M. avium* complex (MAC), and *M. kansasii* strains, main NTM of clinical relevance. For this, 3 reference strains and 51 clinical isolates were tested against clarithromycin, amikacin, ciprofloxacin, cefoxitin, doxycycline, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and rifampicin. The results obtained demonstrated that the assay using TTC and the broth microdilution method recommended by the Clinical & Laboratory Standards Institute had essential agreement above 91%, 92%, and 100%, and categorical agreement above 76%, 84% and 85%, for antimicrobials tested against MABC, MAC and *M. kansasii* strains, respectively. In addition, the test using TTC had agreement 100% for the detection of induced resistance to macrolides against MABC. In conclusion, TTC showed to be a promising colorimetric indicator of cell viability to be used in AST for NTM, allowing an easier, more sensitive, more reliable and safer reading of results.

Keywords: formazan, minimum inhibitory concentration, *Mycobacterium*, tetrazolium salt.

1 **1 INTRODUCTION**

2

3 Infections caused by nontuberculous mycobacteria (NTM) have been increasingly
4 reported worldwide. NTM are widely distributed in the environment and despite to be mostly
5 saprophytes, some species are clinical importance. The *Mycobacterium abscessus* complex
6 (MABC; including *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M.*
7 *abscessus* subsp. *bolletii*), the *M. avium* complex (MAC; including *M. avium* and *M.*
8 *intracellulare*) and *M. kansasii* are among the main species causing infections in humans (Jeon,
9 2019; Zweijpfenning et al., 2018). These infections are characterized by being opportunistic,
10 mainly affecting immunocompromised individuals. In addition, NTM infections often manifest
11 as pulmonary disease, although it also affects extrapulmonary sites or presents as disseminated
12 infection (Griffith et al., 2007; Mota et al., 2020).

13 The treatment of these infections is based on the administration of multiple
14 antimicrobials, and varies according to the species/subspecies of NTM. In general, the treatment
15 is highly complex, have extended duration and is associated with toxicity in patients. Moreover,
16 NTM strains can acquire resistance to antimicrobial agents (Daley et al., 2020; Griffith et al.,
17 2007). Thus, in addition to identifying the NTM causing the infection, the identification of
18 susceptibility profile to the antimicrobials commonly used in its treatment is essential for the
19 implementation of the appropriate therapy (Brown-Elliott and Woods, 2019). For this, the
20 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommends performing an antimicrobial
21 susceptibility testing (AST) based on serial microdilution in cation-adjusted Mueller Hinton
22 (MH) broth. This assay is performed from bacterial cultures, and the reading of the results
23 occurs between 3 to 5 days for rapidly growing mycobacteria (RGM), and can extend up to 14
24 days for the detection of macrolide resistance, and between 7 to 14 days for slowly growing
25 mycobacteria (SGM) (CLSI, 2018).

26 In the CLSI method, the minimum inhibitory concentration (MIC) is determined by
27 visualizing bacterial growth through the turbidity of the wells (CLSI, 2018). In this sense, the
28 MIC interpretation can be difficult and error prone due to variations in growth appearance. For
29 example, some strains may not form well-defined clumps at the bottom of the wells. The use of
30 colorimetric indicators in these assays involves a redox colorimetric reaction from
31 metabolically active cells and has been suggested because, in the presence of bacterial growth,
32 the endpoints are easily visualized by changing the color of the culture medium (Lee et al.,
33 2007; Ramis et al., 2015; Sharma et al., 2021). Like resazurin (Castilho et al., 2015; de Carvalho
34 et al., 2016; Ramis et al., 2015; Sharma et al., 2021), tetrazolium salts have been standardized
35 as cell viability indicators in AST against NTM strains and showed promise for this purpose
36 (Gomez-Flores et al., 1995; Lee et al., 2007; Park et al., 2009; Tsukatani et al., 2015). The 2,3,5-
37 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) is a tetrazolium salt that never before evaluated against
38 NTM. Thus, the aim of the present study was to propose and evaluate an AST using the TTC
39 as a colorimetric indicator for MABC, MAC, and *M. kansasii* strains.

40

41 **2 MATERIALS AND METHODS**

42

43 **2.1 Strains**

44

45 A total of 54 NTM strains were included in the study. Of these, 3 were reference strains
46 (*M. abscessus* ATCC 19977, *M. avium* 03057HC, and *M. kansasii* ATCC 12478) and 51 were
47 clinical isolates (22 isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 8 isolates of *M. abscessus* subsp.
48 *massiliense*, 3 isolates of *M. abscessus* subsp. *bolletii*, 6 isolates of *M. avium*, 6 isolates of *M.*
49 *intracellulare*, and 6 isolates of *M. kansasii*). As quality control, reference strains of
50 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *M. marinum* (ATCC 927) were used for RGM

51 and SGM assays, respectively, as recommended by CLSI (2018). The strains were stored at -
52 70°C at the Mycobacterial Laboratory of the Federal University of Rio Grande (Rio Grande do
53 Sul, Brazil), and were subcultured in Ogawa-Kudoh medium. Experimental activities were
54 carried out using strains of RGM and SGM with up to 10 and 21 days of growth, respectively,
55 and bacterial inoculum were prepared at 0.5 McFarland scale, diluted 1:10 in culture medium.

56

57 **2.2 Antimicrobials**

58

59 MABC strains were tested against clarithromycin (CLR; Sigma-Aldrich, USA, code
60 PHR1038), amikacin (AMK; Sigma-Aldrich, code A2324), ciprofloxacin (CIP; Biochemika,
61 code 17850), ceftiofur (FOX; Sigma-Aldrich, code C4786), doxycycline (DOX; Sigma-
62 Aldrich, code D9891), moxifloxacin (MXF; Sigma-Aldrich, code SML1581), and
63 trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT; Sigma-Aldrich, codes T7883 and S7507). MAC strains
64 were tested against AMK and CLR, and *M. kansasii* strains were tested against rifampicin (RIF;
65 Sigma-Aldrich, code R3501) and CLR. Antimicrobials stock solutions were prepared according
66 to the manufacturer's instructions at 10 mg/mL (for AMK, CIP, CLR, FOX, DOX, SXT), 5
67 mg/mL (for MXF), and 1 mg/mL (for RIF). All stock solutions were stored at -20°C until used.
68 Working solutions were prepared at 4x the final higher test concentration in cation-adjusted
69 MH broth.

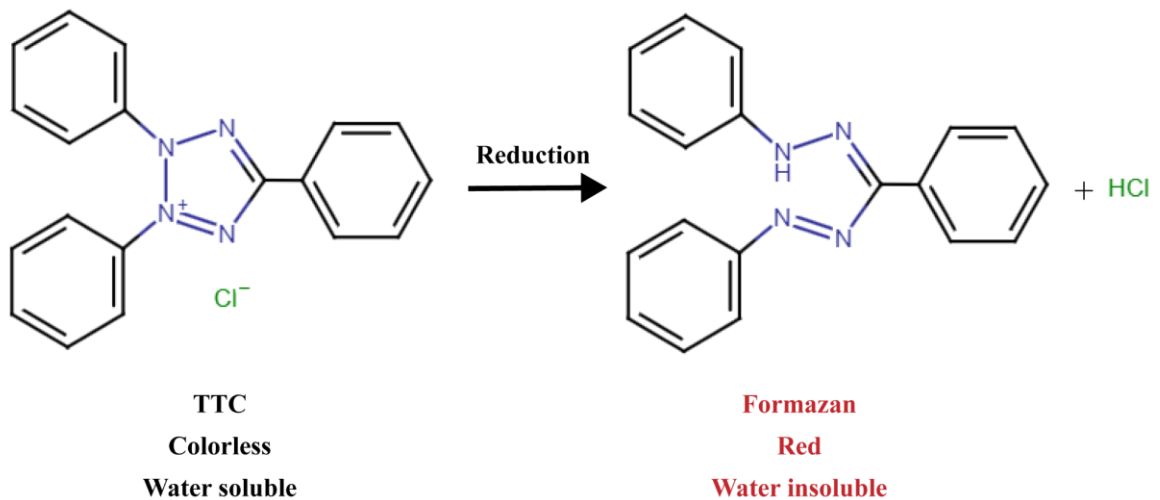
70

71 **2.3 TTC preparation**

72

73 TTC is a non-sulfonated tetrazolium salt that is colorless when dissolved in water. When
74 reduced, it forms red water-insoluble formazan, requiring the use of solvents for its
75 solubilization (STOCKERT et al., 2018; BRAISSANT et al., 2020) (Figure 1). In this study,

76 TTC (Dinâmica Química, Brazil, code 1022) was prepared in sterile distilled water at a
 77 concentration of 5 mg/mL with 5% of Tween 80, as already used for other tetrazolium salts
 78 (Caviedes et al., 2002; Wan Nor Amilah et al., 2016). The final solution was stored in an amber
 79 bottle at 4°C until used.



80
81

82 **Figure 1.** Reduction of TTC by oxidoreductases and dehydrogenases of metabolically active
 83 cells.

84

85 **2.4 Antimicrobial susceptibility testing for MABC strains**

86

87 Each MABC strain was submitted to a broth microdilution assay without TTC (gold
 88 standard) and a broth microdilution assay with TTC (except for CLR, in which two TTC assays
 89 were performed) simultaneously. All AST was performed using 96-well microtiter plates.
 90 Initially, sterile distilled water was added to the all perimeter wells to prevent evaporation from
 91 the test wells. In the assay, one hundred microliters of cation-adjusted MH broth were added to
 92 each well. After, 100 µL of antimicrobial working solution was added to the first line for
 93 performing serial two-fold dilutions of its respective column. In each well, 100 µL of inoculum

94 diluted 1:10 was added. Negative control (with only 200 μ L of broth) and positive control
95 (without antimicrobial, with only 100 μ L of broth and 100 μ L of inoculum) wells were added
96 to each prepared plate.

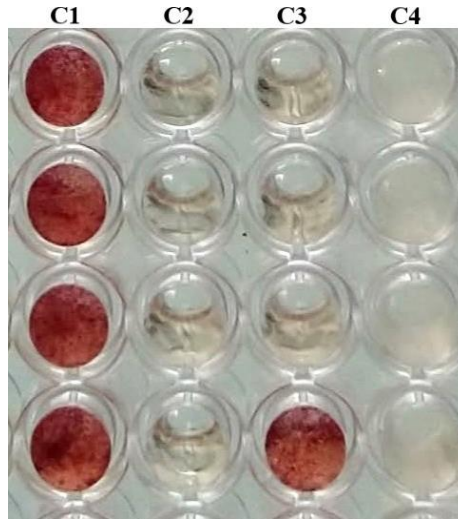
97 The plates were covered, sealed in a plastic bag, and incubated at 37°C in a normal
98 atmosphere. Although CLSI guidelines recommend that MABC strains be incubated also at
99 30°C, all strains included in the present study showed good growth at 37°C. In addition, we
100 evaluated the incubation of MABC strains at 30°C in a pilot study and there were no significant
101 differences when compared to incubation at 37°C (data not shown).

102 In TTC assay for AMK, CIP, FOX, DOX, MXF, SXT, twenty microliters of the TTC
103 solution were added to the wells on day 2 of incubation (48h after initial incubation). The MIC
104 was defined in both assays on day 3 (72h after initial incubation). For CLR, two TTC assays
105 was performed. In the first, twenty microliters of the TTC solution were added to the wells on
106 day 4 of incubation and the results reading was performed on day 5 (CLR Day5). The first
107 reading of the results was performed on day 5 of incubation because this is the last day for the
108 detection of CLR resistance in the diagnostic routine without the need for prolonged incubation,
109 according to the CLSI. In the second assay, twenty microliters of the TTC solution were added
110 to the wells on day 13 of incubation and the results reading was performed on day 14 (CLR
111 Day14). This assay was performed for the detection of CLR-induced resistance and only strains
112 that were not resistant in the initial reading were included.

113 The reading of the gold standard assay was performed through the visualization of
114 turbidity in wells with bacterial growth, according to the CLSI guidelines (CLSI, 2018), while
115 the reading of the TTC assay was performed through the visualization of red color (the
116 concentration of the last well without red staining represented the MIC of the antimicrobial)
117 (Figure 2). The reading of both assays was performed at the same time. The MIC was defined
118 as the lowest concentration of the antimicrobial agent capable of inhibiting bacterial growth.

119 Based on the MIC results obtained, the strain profiles were determined. All assays were
 120 performed in duplicate, and if there were discordant results, the assay was repeated.

121



122

123 **Figure 2.** Representation of wells with and without TTC. Columns (C) 1, 2 and 3: wells with
 124 TTC, red staining indicate bacterial growth. Column 4: wells without TTC addition, wells with
 125 turbidity indicate bacterial growth.

126

127 **2.5 Antimicrobial susceptibility assay for MAC and *M. kansasii* strains**

128

129 Each SGM strain was submitted to two different assays simultaneously. The first assay
 130 was performed without adding the colorimetric indicator (gold standard), according to CLSI,
 131 while the second assay corresponded to an assay with TTC addition on day 7 of incubation.
 132 Both assays were performed to determine the susceptibility to AMK and CLR in MAC strains,
 133 and to RIF and CLR in *M. kansasii* strains. Reading of results was performed on day 9 of
 134 incubation. These AST were performed similarly to the MABC (Section 2.4), except for the
 135 broth used (cation-adjusted MH broth supplemented with 5% OADC), the time of addition of
 136 the colorimetric indicator and the day of reading the results.

137

138 **2.6 Results analysis**

139

140 The MIC values of TTC assay and gold standard were read and interpreted at the same
 141 time. From the MIC values obtained, the susceptibility profile of the strains was classified as
 142 susceptible, intermediate or resistant to antimicrobial agents, according to Table 1. The MIC
 143 values and interpretative categorical results obtained by assays using TTC as a colorimetric
 144 indicator were compared with the microdilution method with visual turbidity reading (gold
 145 standard). For this, essential and categorical agreements were determined. Essential agreement
 146 represented the percentage of strains that had the same MIC value or plus and minus one
 147 dilution step ($\pm 1 \log_2$ dilution). Categorical agreement represented the percentage of strains with
 148 the profile in agreement between the methods. Categorical disagreements were classified as
 149 very major error (resistant strains by TTC assay but susceptible by gold standard), major error
 150 (susceptible strains by TTC assay but resistant by gold standard) and minor error (intermediate
 151 strains by TTC assay but resistant or susceptible by gold standard or vice versa) (Rahman et al.,
 152 2004; Ramis et al., 2015).

153

154 **Table 1.** Range of antimicrobial agents concentrations used in the assays and broth
 155 microdilution interpretive criteria for MABC, MAC and *M. kansasii*.

Specie	Antimicrobial agent	Concentrations range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC breakpoints for category ($\mu\text{g/mL}$)		
			S	I	R
<i>M. abscessus</i> complex	AMK	256 - 8	16	32	≥ 64
	CIP	16 - 0.5	≤ 1	2	≥ 4
	CLR	32 - 1	≤ 2	4	8
	FOX	512 - 16	16	32-64	≥ 128
	DOX	16 - 0.5	≤ 1	2-4	≥ 8

	MXF	16 - 0.5	≤ 1	2	≥ 4
	STX	16/304 - 0.5/9.5	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$
<i>M. avium</i> complex	AMK	256 - 8	≤ 16	32	≥ 64
	CLR	128 - 4	≤ 8	16	≥ 32
<i>M. kansasii</i>	RIF	8 - 0.25	≤ 1	-	≥ 2
	CLR	128 - 4	≤ 8	16	≥ 32

156 AMK = amikacin; CLR = clarithromycin; CIP = ciprofloxacin; FOX = ceftiofur, DOX =
 157 doxycycline; MXF = moxifloxacin; SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; RIF = rifampicin;
 158 S = susceptible; I = intermediate; R = resistant. Adapted from CLSI (2018).

159

160 3 RESULTS

161

162 The MIC results for each assay can be found in Appendix Tables A.1, A.2 and A.3.
 163 According to the gold standard method, 100% (34/34) of MABC strains were resistant to CIP,
 164 MXF and SXT, 97.1% (33/34) were resistant to DOX and 2.9% (1/34) was resistant to AMK.
 165 For FOX, 2.9% (1/34) of the MABC strains presented a susceptible profile, 76.5% (26/34)
 166 presented an intermediate profile and 20.6% (7/34) presented a resistant profile. In addition, for
 167 CLR, 47.1% (16/34) of the MABC strains were susceptible to CLR on the 5th day of incubation,
 168 while 23.5% (8/34) and 29.4% (10/34) showed an intermediate and resistant profile,
 169 respectively. When we evaluated the induced resistance with the strains susceptible and with
 170 intermediate resistance to CLR, 29.2% (7/24) remained susceptible and 70.8% (17/24) strains
 171 turned resistant in the reading performed on the 14th day of incubation.

172 For most antimicrobials tested for MABC, the essential agreement between gold
 173 standard assay and TTC assay was 100%, except for FOX, MXF and CLR Day5. Moreover,
 174 about the categorical agreement, this was 100% just for AMK, DOX, SXT and CLR Day14
 175 (Tables 2 and 3). One minor error was found for CIP, and although this strain did not present

176 essential disagreement because the MIC values differed only by one plate well, this difference
 177 was sufficient to change the susceptibility profile. Eight minor errors were observed for FOX,
 178 however only two of which resulted from essential disagreement. Two minor errors and a very
 179 major error were observed for MXF, all of which were caused by MIC with differences of two
 180 plate wells. In relation to CLR Day5, three minor errors (not included in the essential
 181 disagreements) and one very major error were observed.

182

183 **Table 2.** Number of MABC strains with differences in MIC values and essential agreement
 184 between TTC assay and the gold standard.

Antimicrobial agents	Plate wells (dilutions) of difference ^a							Essential agreement (%)
	0	±1	±2	±3	±4	±5	±6	
AMK	33	1	0	0	0	0	0	100%
CIP	24	9	0	0	0	0	0	100%
FOX	23	9	2	0	0	0	0	94.1%
DOX	34	0	0	0	0	0	0	100%
MXF	29	2	3	0	0	0	0	91.2%
STX	33	1	0	0	0	0	0	100%
CLR Day5	27	6	1	0	0	0	0	97.1%
CLR Day14 ^b	24	0	0	0	0	0	0	100%

185 ^aStrain with 0 (identical MIC) or ±1 (one plus or minus dilution step of difference) was essential
 186 concordant in the methods. ^bFor the prolonged incubation assay with CLR (CLR Day14), only
 187 the 24 strains that did not show a resistant profile at the first reading (CLR Day5) by the gold
 188 standard assay were included. AMK = amikacin; CIP = ciprofloxacin; FOX = cefoxitin, DOX
 189 = doxycycline; MXF = moxifloxacin; SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; CLR =
 190 clarithromycin.

191

192 **Table 3.** Antimicrobials susceptibility profile against 34 MABC strains and categorical
 193 agreement between TTC assay and the gold standard.

Antimicrobial agents	Gold-standard method (n)			TTC assay (n)			Errors (n)			Categorical agreement (%)
	S	I	R	S	I	R	Minor error	Major error	Very major error	
AMK	33	0	1	33	0	1	0	0	0	100%
CIP	0	0	34	0	1	33	1	0	0	97.1%
FOX	1	26	7	2	32	0	8	0	0	76.5%
DOX	1	0	33	1	0	33	0	0	0	100%
MXF	0	0	34	1	2	31	2	0	1	91.2%
STX	0	- ^a	34	0	- ^a	34	0	0	0	100%
CLR Day5	16	8	10	13	9	12	3	0	1	88.2%
CLR Day14 ^b	7	0	17	7	0	17	0	0	0	100%

194 ^a There is no intermediate profile for SXT according to CLSI guidelines. ^b For the prolonged
 195 incubation assay with CLR (CLR Day14), only the 24 strains that did not show a resistant
 196 profile at the first reading (CLR Day5) by the gold standard assay were included. AMK =
 197 amikacin; CIP = ciprofloxacin; FOX = cefoxitin, DOX = doxycycline; MXF = moxifloxacin;
 198 SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; CLR = clarithromycin; S = susceptible; I =
 199 intermediate; R = resistant.

200

201 In relation to SGM strains, according to the gold standard method, 100% (13/13) of
 202 MAC strains were susceptible to AMK, and 92.3% (12/13) to CLR (the exception was with one
 203 *M. intracellulare* strain). About *M. kansasii*, all strains (7/7) were susceptible to CLR, and
 204 85.7% (6/7) were susceptible to RIF. Against MAC, the assays showed 100% of essential and
 205 categorical agreement for AMK. For CLR, the essential and categorical agreement were 92.3%
 206 and 84.6%, respectively. In this case, one minor error (represented by a strain with one plate
 207 well of difference) and one very major error (represented by a strain with essential disagreement

208 of five plate wells of difference) were observed. Regarding *M. kansasii*, the assays showed
 209 100% of essential and categorical agreement for CLR, and these agreements were 100% and
 210 85.7% for RIF, respectively. One major error was observed, although this strain did not
 211 represent essential disagreement as the MIC values differed only by one plate well (Tables 4
 212 and 5).

213

214 **Table 4.** Number of SGM strains with differences in MIC values and essential agreement
 215 between TTC assay and the gold-standard.

Specie	Antimicrobial agents	Dilutions steps of difference ^a							Essential agreement (%)
		0	±1	±2	±3	±4	±5	±6	
<i>M. avium</i> complex (n = 13)	AMK	13	0	0	0	0	0	0	100%
	CLR	11	1	0	0	0	1	0	92.3%
<i>M. kansasii</i> (n = 7)	RIF	6	1	0	0	0	0	0	100%
	CLR	7	0	0	0	0	0	0	100%

216 ^aStrain with 0 (identical MIC) or ±1 (one plus or minus dilution step of difference) was essential
 217 concordant in the methods. AMK = amikacin; CLR = clarithromycin; RIF = rifampicin.

218

219 **Table 5.** Antimicrobials susceptibility profile against SGM strains and categorical agreement
 220 between TTC assay and the gold standard.

Specie	Antimicrobial agents	Gold-standard method (n)			TTC assay (n)			Errors (n)			Categorical agreement (%)
		S	I	R	S	I	R	Minor error	Major error	Very major error	
<i>M. avium</i> complex (n = 13)	AMK	13	0	0	13	0	0	0	0	0	100%
	CLR	12	0	1	11	1	1	1	0	1	84.6%
<i>M. kansasii</i> (n = 7)	RIF	6	- ^a	1	7	- ^a	0	0	1	0	85.7%
	CLR	7	0	0	7	0	0	0	0	0	100%

221 ^aThere is no intermediate profile for RIF according to CLSI guidelines. AMK = amikacin; CLR
222 = clarithromycin; RIF = rifampicin; S = susceptible; I = intermediate; R = resistant.

223

224 **4 DISCUSSION**

225

226 In the present study, an AST for NTM was proposed and evaluated, using a tetrazolium
227 salt as a colorimetric indicator of cell viability. Tetrazolium salts include several compounds,
228 such as TTC, whose use is based on the redox activity of metabolically active cells (Braissant
229 et al., 2020; Stockert et al., 2018). TTC is widely used in histological stains for the detection of
230 ischemic tissues (Chang et al., 2021; Li et al., 2018), and in microbiological assays to identify
231 resistance to antimicrobial agents (Saviano and Lourenço, 2018; Veiga et al., 2019). For
232 mycobacteria, TTC was previously tested in *M. tuberculosis* AST on tube and microplate
233 format (De Logu et al., 2001; Mohammadzadeh et al., 2006; Shinu et al., 2016). However, to
234 our knowledge, this is the first study to evaluate its use in AST against NTM strains.

235 The procedure of TTC assay (preparation of the medium, antimicrobials and bacterial
236 inoculum) is the same of the gold standard assay, recommended by the CLSI (CLSI, 2018),
237 except for the addition of the colorimetric indicator. Previous studies suggested the TTC
238 addition only after adequate bacterial growth in order to avoid possible interference in growth
239 (Rahman et al., 2014; Veiga et al., 2019). Thus, based on preliminary standardization assays
240 (data not shown), we proposed adding TTC 24 and 48 hours before reading the results for RGM
241 and SGM, respectively. TTC provided an easier reading of the results, allowing an identification
242 more accurate and reliable of MIC endpoints compared to the gold standard.

243 In this study, TTC assays showed an essential agreement above 91% with the gold
244 standard in detecting the susceptibility profile to antimicrobials against MABC. About the
245 categorical agreement, this was above 88% for all antimicrobials, with exception of FOX. High

246 agreement with the microdilution assay recommended by CLSI has also been found for other
247 tetrazolium salts. The assay using 2,3-di-phenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) as
248 colorimetric indicator, showed a categorical agreement above 95% for CLR, AMK, CIP, FOX,
249 DOX, imipenem and sulfamethoxazole against *M. abscessus* isolates (Lee et al., 2007).

250 In the present research, a lowest categorical agreement was found for FOX (76.5%). For
251 this antimicrobial, 23.5% (8/34) of the strains presented minor errors, that means, these strains
252 were classified with intermediate profile by one assay and resistant/susceptible by other. It is
253 emphasized that 87.5% (7/8) of these strains had a resistant profile by gold standard assay and
254 intermediate by TTC assay. Previously, in a colorimetric assay using STC, it had been observed
255 that the FOX against *M. fortuitum*, another RGM specie, had a greater number of minor errors
256 when compared to other antimicrobials (27.3% versus $\leq 5.5\%$) (Lee et al., 2007). Similarly, in
257 others assays using resazurin as colorimetric indicator in a panel of RGM strains, lower
258 categorical agreement with the visual reading of turbidity were related to minor errors for FOX
259 (Carvalho et al., 2021; Ramis et al., 2015).

260 It is noteworthy that FOX is one of the antimicrobials whose inclusion in the multidrug
261 regimen depends on the susceptibility profile of the CMAB strain against this antimicrobial *in*
262 *vitro*. In this way, other parenteral agents can be chosen to be introduced into the therapy, for
263 example imipenem instead of FOX (Daley et al., 2020). Thus, it is observed that expanding the
264 panel of antimicrobials tested by the method evaluated in the present study may be necessary,
265 since it is recommended to test the susceptibility profile of an additional number of parenteral
266 antimicrobials (imipenem and tigecycline), as well as of oral antimicrobials (linezolid and
267 clofazimine) (Daley et al., 2020).

268 For detecting resistance to CLR, a categorical agreement of 88.2% was found in CLR
269 Day5. However, the four strains that showed errors (three minor errors and one very major
270 error) were resistant to CLR in CLR Day14, and no disagreement between assays was observed.

271 It is emphasized that in the initial reading, by the gold standard and the TTC assay, two of these
272 strains had susceptible and intermediate profile to CLR, one had a susceptible and resistant
273 profile to CLR and one had an intermediate and resistant profile to CLR, respectively. Thus,
274 the results obtained demonstrated that the disagreements on initial reading are closely related
275 to the induction of a change in the profile of these strains to the antimicrobial, and are non-
276 existent after prolonged incubation.

277 Regarding antimicrobial susceptibility profiles against MABC, the results obtained in
278 our study are in agreement with those previously described (de Carvalho et al., 2016; Lee et al.,
279 2007; Park et al., 2009; Ramis et al., 2015; Sharma et al., 2021). For CLR, the antimicrobial
280 agent that is the basis of the therapeutic regimen used against MABC infections, initially 47.1%
281 (16/34) and 23.5% (8/34) MABC strains had susceptible and intermediate profile, respectively.
282 However, CLR-induced resistance was identified in 70.8% (17/24) of these strains after the
283 prolonged incubation period, all of which belong to *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Thus, the
284 importance of reading on the 14th day incubation is highlighted to obtain the correct profile of
285 these strains. CLR-induced resistance can occur in *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M.*
286 *abscessus* subsp. *bolletii* due to the presence of the functional *erm(41)* gene. This gene is
287 truncated in strains of *M. abscessus* subsp. *massiliense*, therefore, in strains of this subspecies,
288 phenotypic resistance mediated by this gene, in general, is not observed (Brown-Elliott and
289 Woods, 2019).

290 AMK was the most potent antimicrobial for MABC strains, with only one strain
291 resistant to it. After macrolides, AMK is the most important antimicrobial against MABC, being
292 essential in cases resistant to macrolides. The other antimicrobials used in association with CLR
293 and AMK in the treatment of MABC infections should be chosen based on their susceptibility
294 in vitro (Daley et al., 2020; Griffith and Daley, 2022). Our results showed that most MABC
295 strains were resistant to CIP, DOX, MXF, and SXT. For FOX, most strains showed an

296 intermediate profile, followed by a resistant profile. Thus, the results of this study demonstrated
297 high rates of antimicrobial resistance against MABC strains, resulting in a reduced number of
298 effective antimicrobials available and in the complexity of the treatment of these infections.

299 To evaluate the agreement between the AST against SGM strains, the TTC assay
300 showed an essential and categorical agreement with the gold standard above of 92% and 84%,
301 respectively. The results are similar to the study by Tsukatani et al. (2015), who evaluated the
302 use of the water-soluble 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-
303 tetrazolium monosodium salt (WST-1) in AST against *M. avium* and *M. kansasii* strains. AMK,
304 CLR and RIF were among the antimicrobials panel tested, and the MIC values obtained in the
305 WST-1 assay had agreement of 90.3% and 94.3% in the *M. avium* and *M. kansasii* assays,
306 respectively (Tsukatani et al., 2015). It should be noted that although both are tetrazolium salts,
307 the assay proposed by Tsukatani differs from ours because it requires an electron mediator (due
308 to the sulfonated nature of the colorimetric indicator) and also because the results are interpreted
309 through a microplate reader.

310 Furthermore, a MAC strain with essential disagreement of five plate wells of difference
311 in CLR assays was observed, with the highest MIC value occurring in the TTC assay. This
312 result was repeated in more than two replicates of the TTC and gold standard assays. Therefore,
313 it demonstrates that the red staining in the TTC assay in the presence of metabolically active
314 cells increased the sensitivity of detecting bacterial growth in the wells. In contrast, in the gold
315 standard assay, turbidity sufficiently perceptible to the naked eye was not generated.

316 Regarding the antimicrobials susceptibility profile against SGM strains, all MAC strains
317 were susceptible to AMK, while one was resistant to CLR. About *M. kansasii*, all strains of
318 were susceptible to CLR and only one was resistant to RIF. Macrolides (such as CLR) and
319 rifamycins (such as RIF) are the mainstay of treatment for infections caused by MAC and *M.*
320 *kansasii*, respectively. In the treatment of MAC infections, other antimicrobials such as

321 ethambutol and RIF are also used in the basic regimen, as well as ethambutol and isoniazid for
322 *M. kansasii* infections (Daley et al., 2020). However, susceptibility test to these antimicrobials
323 in these mycobacterial species is not recommended as *in vitro* MIC results have poor
324 relationship to the clinic (Brown-Elliott and Woods, 2019; CLSI, 2018). Previous studies also
325 showed that AMK and CLR are effective against MAC and *M. kansasii*, respectively, therefore
326 they are antimicrobials often administered for the treatment of infections caused by these NTM
327 species (Brown-Elliott and Woods, 2019; Daley et al., 2020).

328 The TTC may have some advantages when compared to other colorimetric indicators
329 commonly used for bacteria. When compared to 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
330 diphenyltetrazolium bromide (MTT), TTC is less toxic against Gram-negative bacteria, since
331 much higher concentrations than MTT would be required to inhibit bacterial growth. Rahman
332 et al. (2014) showed that MTT concentrations >0.007% would already be sufficient to inhibit
333 bacterial growth, while no inhibition was observed for TTC at concentrations <0.125%. In the
334 present study, TTC at 5 mg/mL (0.5%) was used, when added to the well of the 96-well plate,
335 it would be at a concentration of 0.045%. In addition, about cost, the TTC powder have a lower
336 cost when compared to other colorimetric indicators, such as resazurin and MTT:
337 approximately \$10, \$33 and \$161 per gram, respectively, at the time of the present study
338 (Sigma-Aldrich, 2022a; 2022b; 2022c). In addition, the performance of the assay in
339 microdilution format, when compared to colorimetric assays performed in tubes as performed
340 by Mohammadzadeh et al. (2006) and Shinu et al. (2016), has the advantage of allowing
341 multiple antimicrobials and samples to be tested simultaneously, requiring a smaller number of
342 materials and reagents.

343

344 **5 CONCLUSIONS**

345

346 Although of this study have evaluate TTC assay only against MABC, MAC and *M.*
347 *kansasii*, major NTM of medical importance, the results obtained demonstrated that the assay
348 had high agreement with the microdilution method recommended by the CLSI. In addition,
349 TTC allowed an easier and more reliable reading of the results, and made the detection of
350 bacterial growth more sensitive due to the presence of staining compared to turbidity
351 visualization. Therefore, TTC is a promising tetrazolium salt to be used as a colorimetric
352 indicator of cell viability in AST. However, we suggest to evaluate the proposed assay with
353 another's NTM species and other antimicrobial agents.

354

355 **6 FUNDING**

356

357 This study was financed in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do
358 Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
359 Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

360

361 **7 ACKNOWLEDGEMENTS**

362

363 The authors would like to thank CAPES and FAPERGS for funding and the Federal
364 University of Rio Grande for providing the infrastructure for the study.

365

366 **8 REFERENCES**

367

368 Braissant, O., Astasov-Frauenhoffer, M., Waltimo, T., Bonkat, G., 2020. A Review of Methods
369 to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. *Front. Microbiol.* 11,
370 547458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547458>.

- 371 Brown-Elliott, B.A., Woods, G.L., 2019. Antimycobacterial Susceptibility Testing of
372 Nontuberculous Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 57(10), e00834-19.
373 <https://doi.org/10.1128/jcm.00834-19>.
- 374 Carvalho, N.F.G, Pedace, C.S., de Almeida, A.R.B., Simeão, F.C.S., Chimara, E., 2021.
375 Evaluation of drug susceptibility in nontuberculous mycobacteria using the SLOMYCO and
376 RAPMYCO sensititre plates. *Int. J. Mycobacteriol.* 10(4), 379-387.
377 https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_219_21.
- 378 Castilho, A.L., Caleffi-Ferracioli, K.R., Canezin, P.H., Dias Siqueira, V.L., de Lima Scodro,
379 R.B., Cardoso, R.F., 2015. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria
380 by resazurin broth microdilution assay. *J. Microbiol. Methods.* 111, 119–121.
381 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.007>.
- 382 Caviedes, L., Delgado, J., Gilman, R.H., 2002. Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and
383 Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of
384 *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1873–1874.
385 <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1873-1874.2002>.
- 386 Chang, H.H., Yeh, S.J., Chiang, M.C., Hsieh, S.T., 2021. Segmentation of Rat Brains and
387 Cerebral Hemispheres in Triphenyltetrazolium Chloride-Stained Images after Stroke.
388 *Sensors (Basel)*. 21(21), 7171. <https://doi.org/10.3390/s21217171>.
- 389 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2018. Susceptibility Testing of
390 Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd ed. Clinical and
391 Laboratory Standards Institute, Wayne.
- 392 Daley, C.L., Iaccarino, J.M., Lange, C., Cambau, E., Wallace, R.J. Jr., Andrejak, C., Böttger,
393 E.C., Brozek, J., Griffith, D.E., Guglielmetti, L., Huitt, G.A., Knight, S.L., Leitman, P.,
394 Marras, T.K., Olivier, K.N., Santin, M., Stout, J.E., Tortoli, E., van Ingen, J., Wagner, D.,
395 Winthrop, K.L., 2020. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an

- 396 official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Eur. Respir. J.* 56(1),
397 2000535. <https://doi.org/10.1183/13993003.00535-2020>.
- 398 de Carvalho, N.F.G., Sato, D.N., Pavan, F.R., Ferrazoli, L., Chimara, E., 2016. Resazurin
399 Microtiter Assay for Clarithromycin Susceptibility Testing of Clinical Isolates of
400 *Mycobacterium abscessus* Group. *J. Clin. Lab. Anal.* 30(5), 751–755.
401 <https://doi.org/10.1002/jcla.21933>.
- 402 De Logu, A., Uda, P., Pellerano, M.L., Pusceddu, M.C., Saddi, B., Schivo, M.L., 2001.
403 Comparison of Two Rapid Colorimetric Methods for Determining Resistance of
404 *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin, Isoniazid, and Streptomycin in Liquid Medium.
405 *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(1), 33–39. <https://doi.org/10.1007/pl00011234>.
- 406 Gomez-Flores, R., Gupta, S., Tamez-Guerra, R., Mehta, R.T., 1995. Determination of MICs for
407 *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric
408 method. *J. Clin. Microbiol.* 33(7), 1842–1846. [https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1842-](https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1842-1846.1995)
409 1846.1995.
- 410 Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland,
411 S.M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M.F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von
412 Reyn, C.F., Wallace, R.J. Jr., Winthrop, K., 2007. An Official ATS/IDSA Statement:
413 Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am. J.*
414 *Resp. Crit. Care Med.* 175(4), 367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571st>.
- 415 Griffith, D.E., Daley, C.L., 2022. Treatment of *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease.
416 *Chest.* 161(1), 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.07.035>.
- 417 Jeon, D., 2019. Infection Source and Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Lung
418 Disease. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. 82(2), 94-101. <https://doi.org/10.4046/trd.2018.0026>.
- 419 Lee, S.M., Kim, J. m., Jeong, J., Park, Y.K., Bai, G.H., Lee, E.Y., Lee, M.K., Chang, C.L.,
420 2007. Evaluation of the Broth Microdilution Method Using 2,3-Diphenyl-5-thienyl-(2)-

- 421 tetrazolium Chloride for Rapidly Growing Mycobacteria Susceptibility Testing. J. Korean
422 Med. Sci. 22(5), 784-790. <https://doi.org/10.3346/jkms.2007.22.5.784>.
- 423 Li, L., Yu, Q., Liang, W., 2018. Use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-stained brain tissues
424 for immunofluorescence analyses after focal cerebral ischemia in rats. Pathol. Res. Pract.
425 214(1), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.11.016>.
- 426 Mohammadzadeh, A., Farnia, P., Ghazvini, K., Behdani, M., Rashed, T., Ghanaat, J., 2006.
427 Rapid and low-cost colorimetric method using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for
428 detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J. Med. Microbiol. 55(Pt 12),
429 1657–1659. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46442-0>.
- 430 Mota, M.A. de L., de Melo, D.M., Beserra, F.L.C.N., Nogueira Filho, G.A., Pinto, L.M., Souza,
431 R.D.J., Sousa, S.S., Mota, R.S., Neto, R.J.P., Leit, T.M.J.S., 2020. Clinical-epidemiological
432 profile and factors related to the mortality of patients with nontuberculous mycobacteria
433 isolated at a reference hospital in Ceará, Northeastern Brazil. I. J. Mycobacteriol. 9(1), 83-
434 90. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_12_20.
- 435 Park, Y.K., Koh, W.J., Kim, S.O., Shin, S., Kim, B.J., Cho, S.N., Lee, S.M., Chang, C.L., 2009.
436 Clarithromycin Susceptibility Testing of *Mycobacterium avium* Complex Using 2,3-
437 Diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium Chloride Microplate Assay with Middlebrook 7H9
438 Broth. J. Korean Med. Sci. 24(3), 511–512. <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.3.511>.
- 439 Rahman, M., Kühn, I., Rahman, M., Olsson-Liljequist, B., Möllby, R., 2004. Evaluation of a
440 Scanner-Assisted Colorimetric MIC Method for Susceptibility Testing of Gram-Negative
441 Fermentative Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70(4), 2398–2403.
442 <https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2398-2403.2004>.
- 443 Ramis, I.B., Cnockaert, M., von Groll, A., Nogueira, C.L., Leão, S.C., Andre, E., Simon, A.,
444 Palomino, J.C., da Silva, P.E.A., Vandamme, P., Martin, A., 2015. Antimicrobial
445 susceptibility of rapidly growing mycobacteria using the rapid colorimetric method. Eur. J.

- 446 Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34(7), 1403–1413. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2365-2>.
- 447 Saviano, A.M., Lourenço, F.R., 2018. Rapid microbiological methods (RMMs) for evaluating
448 the activity of cephalosporin antibiotics employing triphenyltetrazolium chloride. *Talanta*.
449 185, 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.020>.
- 450 Sharma, M., Malhotra, B., Khandelwal, S., 2021. Drug susceptibiity testing of nontuberculous
451 mycobacteria by broth microdilution method. *Indian J. Med. Microbiol.* 39(3), 306-310.
452 <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.03.015>.
- 453 Shinu, P., Singh, V., Nair, A., 2016. Isoniazid and rifampin drug susceptibility testing:
454 application of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride assay and microscopic-observation drug-
455 susceptibility assay directly on Ziehl-Neelsen smear positive sputum specimens. *Braz. J.*
456 *Infect. Dis.* 20(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.09.006>.
- 457 Sigma-Aldrich, 2022a. Sigma products: 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (T8877).
458 <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/t8877> (accessed 02 February 2022).
- 459 Sigma-Aldrich, 2022b. Sigma products: Resazurin sodium salt (R7017).
460 <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/r7017> (accessed 02 February 2022).
- 461 Sigma-Aldrich, 2022c. Sigma products: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (M5655).
462 <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/m5655> (accessed 02 February 2022).
- 463 Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., Blázquez-Castro, A., 2018. Tetrazolium salts
464 and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and
465 labeling perspectives. *Acta Histochem.* 120(3), 159–167.
466 <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>.
- 467 Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Ikegami, T., Ishiyama, M., Ezoë, T., Matsumoto, K.,
468 2015. Rapid susceptibility testing for slowly growing nontuberculous mycobacteria using a
469 colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium
470 WST-1. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34(10), 1965–1973.

- 471 <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2438-2>.
- 472 Veiga, A., Toledo, M. da G.T., Rossa, L.S., Mengarda, M., Stofella, N.C.F., Oliveira, L.J.,
473 Gonçalves, A.G., Murakami, F.S., 2019. Colorimetric microdilution assay: Validation of a
474 standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds.
475 J. Microbiol. Methods. 162, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>.
- 476 Wan Nor Amilah, W.A.W., Mohammad Lukman, Y., Siti Suraiya, M.N., Noor Izani, N.J.,
477 2016. Direct tetrazolium microplate assay (TEMA) for rapid drug susceptibility test
478 screening of *Mycobacterium tuberculosis*. Trop. Biomed. 33(4), 814–823.
479 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33579079/>.
- 480 Zweijpfenning, S.M.H., Ingen, J.V., Hoefsloot, W., 2018. Geographic Distribution of
481 Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Clinical Specimens: A Systematic Review.
482 Sem. Respir. Crit. Care Med. 39(3), 336–342. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1660864>.

Appendix A. Supplementary data

Appendix Table 1. MIC values obtained for MABC strains.

Strains	Species	AMK		CIP		FOX		DOX		MXF		SXT		CLR Day5		CLR Day14	
		Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay
Isolate 01	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	8	32	32	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	≤1	≤1	>32	>32
Isolate 02	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	8	64	32	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	4	4	>32	>32
Isolate 03	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	8	128	64	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	≤1	2	>32	>32
Isolate 04	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	>256	>256	>16	16	128	64	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	4	4	>32	>32
Isolate 05	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	4	2	128	32	≤0,5	≤0,5	4	1	>16-304	16-304	32	32	>32	>32
Isolate 06	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	16	16	256	64	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	4	4	>32	>32
Isolate 07	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	16	≤8	8	8	32	32	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	2	2	>32	>32
Isolate 08	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	16	16	64	64	>16	>16	16	16	>16-304	>16-304	2	≤1	16	16
Isolate 09	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	8	8	≤16	≤16	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	8	8	>32	>32
Isolate 10	<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>	≤8	≤8	>16	16	32	32	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	>32	>32	>32	>32
Isolate 11	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	>16	>16	64	64	>16	>16	>16	>16	>16-304	>16-304	≤1	≤1	≤1	≤1
Isolate 12	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	8	128	64	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	≤1	≤1	>32	>32
Isolate 13	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	>16	>16	32	32	>16	>16	>16	>16	>16-304	>16-304	≤1	≤1	≤1	≤1

AMK = amikacin; CIP = ciprofloxacin; FOX = ceftioxin, DOX = doxycycline; MXF = moxifloxacin; SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; CLR = clarithromycin.

Appendix Table 1. MIC values obtained for MABC strains (continuation).

Strains	Species	AMK		CIP		FOX		DOX		MXF		SXT		CLR Day5		CLR Day14	
		Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay
Isolate 14	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	>16	>16	64	64	>16	>16	>16	>16	>16-304	>16-304	≤1	≤1	≤1	≤1
Isolate 15	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	>16	>16	32	32	>16	>16	16	16	>16-304	>16-304	≤1	≤1	≤1	≤1
Isolate 16	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	4	32	32	>16	>16	8	2	>16-304	>16-304	4	8	>32	>32
Isolate 17	<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>	≤8	≤8	8	8	64	64	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	>32	>32	>32	>32
Isolate 18	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	16	16	64	32	>16	>16	16	8	>16-304	>16-304	4	4	32	32
Isolate 19	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	8	64	32	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	>32	32	>32	>32
Isolate 20	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	>16	16	64	64	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	4	4	>32	>32
Isolate 21	<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>	≤8	≤8	8	8	32	32	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	32	32	>32	>32
Isolate 22	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	16	16	16	16	64	64	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	>32	>32	>32	>32
Isolate 23	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	16	8	64	64	>16	>16	8	2	>16-304	>16-304	4	4	>32	>32
Isolate 24	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	16	16	32	32	>16	>16	16	16	>16-304	>16-304	2	4	>32	>32
Isolate 25	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	16	16	>16	16	128	64	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	≤1	≤1	8	8
Isolate 26	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	4	4	64	64	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	2	8	>32	>32
Isolate 27	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	16	16	32	≤16	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	>32	>32	>32	>32
Isolate 28	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	16	16	32	32	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	2	4	>32	>32
Isolate 29	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	16	16	16	>16	32	32	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	>32	>32	>32	>32

AMK = amikacin; CIP = ciprofloxacin; FOX = ceftioxin, DOX = doxycycline; MXF = moxifloxacin; SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; CLR = clarithromycin.

Appendix Table 1. MIC values obtained for MABC strains (continuation).

Strains	Species	AMK		CIP		FOX		DOX		MXF		SXT		CLR Day5		CLR Day14	
		Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay
Isolate 30	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	>16	>16	32	32	>16	>16	>16	>16	>16-304	>16-304	≤1	≤1	≤1	≤1
Isolate 31	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	8	64	64	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	>32	>32	>32	>32
Isolate 32	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	16	8	128	64	>16	>16	8	8	>16-304	>16-304	≤1	≤1	≤1	≤1
Isolate 33	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	≤8	≤8	>16	>16	32	32	>16	>16	16	>16	>16-304	>16-304	≤1	≤1	≤1	≤1
ATCC 19977	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	≤8	≤8	8	8	32	32	>16	>16	4	4	>16-304	>16-304	4	4	>32	>32

AMK = amikacin; CIP = ciprofloxacin; FOX = ceftiofloxacin, DOX = doxycycline; MXF = moxifloxacin; SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; CLR = clarithromycin.

Appendix Table 2. MIC values obtained for MAC strains.

Strains	Species	AMK		CLR	
		Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay
Isolate 01	<i>M. avium</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 02	<i>M. avium</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 03	<i>M. avium</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 04	<i>M. avium</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 05	<i>M. avium</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 06	<i>M. avium</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 07	<i>M. intracellulare</i>	≤8	≤8	32	16
Isolate 08	<i>M. intracellulare</i>	≤8	≤8	8	>256
Isolate 09	<i>M. intracellulare</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 10	<i>M. intracellulare</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 11	<i>M. intracellulare</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
Isolate 12	<i>M. intracellulare</i>	≤8	≤8	≤4	≤4
03057 HC	<i>M. avium</i>	≤8	≤8	≤4	≤4

AMK = amikacin; CLR = clarithromycin.

Appendix Table 3. MIC values obtained for *M. kansasii* strains.

Strains	RIF		CLR	
	Gold standard	TTC assay	Gold standard	TTC assay
Isolate 01	≤0,25	≤0,25	≤4	≤4
Isolate 02	≤0,25	≤0,25	≤4	≤4
Isolate 03	≤0,25	≤0,25	≤4	≤4
Isolate 04	≤0,25	≤0,25	≤4	≤4
Isolate 05	≤0,25	≤0,25	≤4	≤4
Isolate 06	2	1	≤4	≤4
ATCC 12478	≤0,25	≤0,25	≤4	≤4

RIF = rifampicin; CLR = clarithromycin.

6. CONCLUSÕES

Com base no exposto pelo presente estudo, pode-se concluir que:

1. A maioria das cepas de CMAB apresentaram perfil resistente ou intermediário para os antimicrobianos ciprofloxacina, cefoxitina, doxiciclina, moxifloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol e claritromicina testados, exceto para amicacina, onde somente uma cepa foi resistente;

2. A maioria das cepas de CMA e *M. kansasii* foram sensíveis aos antimicrobianos para as quais foram testadas (claritromicina e amicacina para CMA e claritromicina e rifampicina para *M. kansasii*). Apenas uma cepa de CMA foi resistente a claritromicina e uma de *M. kansasii* foi resistente a rifampicina;

3. O ensaio de microdiluição em caldo padronizado e proposto, utilizando o TTC como indicador colorimétrico de viabilidade celular, pode ser utilizado em TSA frente as principais espécies de MNT de importância clínica;

4. Devido a coloração vermelha quando reduzido, o TTC proporcionou uma leitura mais fácil e segura da CIM quando comparada a leitura visual da turbidez;

5. Para a maioria das cepas de MNT houve concordância entre o ensaio utilizando o TTC e o ensaio padrão-ouro: para ensaios com CMAB, concordância essencial entre 91% e 100% e concordância categórica entre 76% e 100%; para ensaios com CMA, concordância essencial entre 92% e 100% e concordância categórica entre 84% e 100%; e para ensaios com *M. kansasii*, concordância essencial de 100% e concordância categórica entre 85% e 100%;

6. O ensaio utilizando o TTC pode ser utilizado na detecção de resistência induzida a claritromicina em cepas do CMAB, pois apresentou 100% de concordância essencial e categórica com o ensaio padrão-ouro;

Dessa forma, apesar de estudos com outras espécies de MNT causadoras de infecção em humanos serem necessários, o ensaio com TTC é uma potencial alternativa de TSA para ser utilizada em laboratórios que realizam o diagnóstico de micobacterioses.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

As MNT são causadoras de infecções oportunistas que possuem tratamento complexo e frequentemente estão associadas a resistência aos antimicrobianos. Dessa forma, a identificação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos é fundamental para a implementação do esquema terapêutico adequado. O presente estudo foi o primeiro a propor e avaliar o uso do TTC em TSA frente a cepas de MNT, e este se mostrou promissor para a identificação de cepas de CMAB, CMA e *M. kansasii* resistentes aos antimicrobianos. Nesse contexto, as seguintes perspectivas futuras podem ser pontuadas:

- Avaliação da toxicidade da solução de TTC utilizada nos ensaios, frente as cepas de referência incluídas no estudo. Espera-se que a toxicidade do TTC encontrado corrobore com os resultados previamente obtidos para outras espécies bacterianas;
- Avaliação do TTC como indicador colorimétrico em um TSA liofilizado, que vem sendo desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio Grande;
- Conclusão do artigo de revisão sobre os métodos colorimétricos disponíveis para identificação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos frente a micobactérias (incluindo CMTB e MNT).

APÊNDICE

ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Trabalhos apresentados e/ou publicados em anais de eventos:

1. Impacto da pandemia de COVID-19 no diagnóstico da tuberculose em um laboratório do extremo sul do Brasil. 19ª Mostra de Produção Universitária – 22º Encontro de Pós Graduação (EPG), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, 2020.
2. GeneXpert para o diagnóstico laboratorial de tuberculose: impactos da pandemia de COVID-19 na sua realização. XIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 2021.
3. Diagnosis of tuberculosis in the public health system in Southern Extreme Brazil: how did the COVID-19 pandemic impacted on the detection of new tuberculosis cases? XXV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Assunção, Paraguai, 2021.
4. Protótipo de ensaio fenotípico liofilizado para a detecção de tuberculose multidroga resistente: um estudo piloto. Anais da 20ª Mostra de Produção Universitária – 23º Encontro de Pós Graduação (EPG), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, 2021.
5. Avaliação de um sal de tetrazólio como indicador colorimétrico na determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em cepas do complexo *Mycobacterium abscessus*. VIII Workshop REDE-TB – 56ª Edição do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (MEDTROP), Recife, Brasil, 2021.

Participação em projetos de pesquisa e extensão:

1. Projeto de pesquisa – Inovação, desenvolvimento e validação de plataformas para o diagnóstico laboratorial da tuberculose e outras micobacterioses de importância clínica – CHAMADA FAPERGS/MS/CNPq 08/2020 - PPSUS.

2. Projeto de pesquisa – Impacto da pandemia de COVID-19 no diagnóstico laboratorial de tuberculose no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul.

3. Projeto de extensão – Diagnóstico de tuberculose e micobacterioses, e avaliação de métodos laboratoriais, em uma região de elevada prevalência dessas doenças.

Artigos científicos desenvolvidos ou em desenvolvimento:

1. Impacto da pandemia de COVID-19 no diagnóstico laboratorial de tuberculose no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul (Artigo original – Submetido a Revista Epidemiologia e Controle de Infecção).

2. Simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex by a multiplex PCR (Artigo original – Em processo de edição para submissão).

3. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures by molecular and immunochromatographic methods in a setting with high TB burden (Artigo original – Em processo de edição para submissão).

4. *Mycobacterium abscessus* infections: A challenge for medical practice (Artigo de revisão – Em processo de edição para submissão).

5. Métodos colorimétricos para a identificação do perfil de suscetibilidade de micobactérias frente a antimicrobianos (Artigo de revisão – em desenvolvimento).

6. Advances in the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacteria infections (Artigo de revisão – em desenvolvimento).

7. GeneXpert MTB/RIF Ultra no diagnóstico de tuberculose: avaliação da categoria semiquantitativa traços (Artigo original – em desenvolvimento).

Outras atividades:

1. Participação na implementação do diagnóstico molecular de COVID-19 no Hospital Miguel Riet Corrêa Jr. durante o mês de julho de 2020.
2. Mini-curso ministrado na Jornada Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, em 2021: Diagnóstico Laboratorial de COVID-19 - Princípios e técnicas.
3. Co-orientação em andamento de trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas Bacharelado). Título do trabalho: Avaliação de uma categoria semiquantitativa do GeneXpert MTB/RIF Ultra no diagnóstico de tuberculose.