

Diversidade genómica e perfil de resistência dos isolados clínicos de *Mycobacterium avium* circulantes em Portugal entre 2018 e 2022

Genomic diversity and resistance profile of Mycobacterium avium clinical strains circulating in Portugal between 2018 and 2022

Diversité génomique et profil de résistance des isolats cliniques de Mycobacterium avium circulant au Portugal entre 2018 et 2022

Joana Rodrigues

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal; Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Portugal

Sofia Carneiro

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal; Departamento de Ciências da Vida Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa, Portugal

Andrea Santos

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Irene Rodrigues

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Sónia Silva

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Rita Macedo

Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal
rita.macedo@insa.min-saude.pt

Resumo

Introdução: Nos últimos anos, infeções oportunistas por micobactérias não tuberculosas (MNT), têm ganho uma importância crescente na saúde pública, sendo a espécie *Mycobacterium avium*, a principal responsável pelo aumento de casos de doença humana. Estas infeções manifestam-se principalmente a nível respiratório podendo também ocorrer, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, infeção disseminada. Atualmente, o modo de transmissão não está estabelecido, contudo, a exposição ambiental é considerada a principal fonte de infeção. Assim, é essencial a realização de estudos epidemiológicos para identificar possíveis focos de infeção e, deste modo, melhorar os métodos de vigilância, prevenção e controlo da doença.

Objetivo: Avaliação da diversidade genómica e perfil de resistência de isolados clínicos de *Mycobacterium avium* circulantes em Portugal entre 2018 e 2022.

Métodos: Um conjunto de 42 estirpes de *M. avium*, isoladas entre 2018 e 2022, no Laboratório Nacional de Referência para Micobactérias (LNR-TB) do INSA, foi caracterizado quanto à sua diversidade genómica através da metodologia de tipagem molecular MIRU-VNTR. Adicionalmente, foram realizados testes de suscetibilidade fenotípica à claritromicina, moxifloxacina e linezolide em 40 (95%) estirpes e de suscetibilidade molecular por pesquisa de mutações nos genes 16S rRNA (rrs) e 23S rRNA (rrl), associados a resistência a aminoglicosídeos (AG) e macrólidos, respetivamente.

<https://doi.org/10.25761/anaisihmt.453>

Resultados: Os testes de suscetibilidade fenotípica indicaram que 98% (39) das estirpes foram suscetíveis à claritromicina, enquanto apenas 25% (n=10) e 27,5% (n=11) foram suscetíveis ao linezolide e moxifloxacina. Verificou-se uma elevada correlação entre os resultados de testes de suscetibilidade fenotípica e genotípica relativamente aos macrólidos.

A genotipagem por MIRU-VNTR revelou uma grande diversidade genética entre as estirpes. Usando threshold de 1 locus e 2 loci de permissão de diferença entre as estirpes, observou-se o agrupamento de dois clusters moleculares e 37 singletons e oito clusters e 20 singletons, respetivamente. No global, a metodologia MIRU-VNTR obteve um índice discriminatório de 0.9988.

Conclusão: Embora tenham sido detetados clusters moleculares, a análise dos perfis MIRU-VNTR é insuficiente para estabelecer relações epidemiológicas concretas. Para além dos dados demográficos dos doentes são necessários dados clínicos, o que pode requerer a ponderação de um sistema de notificação obrigatória para uma vigilância laboratorial da doença por *M. avium* mais assertiva.

Palavras-chave: Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium avium*, MIRU-VNTR, Genotipagem, Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana, Vigilância laboratorial, Micobactérias não tuberculosas, MNT.

Abstract

Introduction: In recent years, opportunistic infections with nontuberculous mycobacteria (NTM) have gained increasing importance in public health, with *Mycobacterium avium* being the most responsible species for the increase of human disease cases. These infections manifest mainly at the respiratory level, and disseminated infection may also occur, especially in immunocompromised individuals. Currently, the mode of transmission is not established, but environmental exposure is considered the main source of infection. Therefore, epidemiological studies are essential to identify possible foci of infection, and thus improve methods of surveillance, prevention, and control of this type of disease.

Objective: Evaluation of the genomic diversity and resistance profile of clinical isolates of *Mycobacterium avium* circulating in Portugal between 2018 and 2022.

Methods: Between 2018 and 2022, the National Reference Laboratory for Mycobacteria (LNR-TB), at INSA received 103 *M. avium* isolates. Of these, a subset of 42 strains was characterized for genomic diversity using the MIRU-VNTR molecular typing methodology. Additionally, 40 (95%) strains were tested for phenotypic susceptibility to clarithromycin, moxifloxacin, and linezolid, and molecular susceptibility, by screening of mutations in the 16S rRNA (*rrs*) and 23S rRNA (*rpl*) genes associated with resistance to aminoglycosides and macrolides, respectively.

Results: Phenotypic susceptibility testing indicated that 98% (39) of the strains were susceptible to clarithromycin, while only 25% (n=10) and 27.5% (n=11) were susceptible to linezolid and moxifloxacin. There was a high correlation between the results of phenotypic and genotypic susceptibility testing with respect to macrolides.

MIRU-VNTR genotyping revealed a high genetic diversity among the strains. Using a threshold of 1 *locus* and 2 *loci* between strains, it was observed two molecular clusters and 37 singletons and eight clusters and 20 singletons, respectively. Overall, the MIRU-VNTR methodology allowed a discriminatory power of 0.9988.

Conclusion: Although molecular clusters were detected, the analysis of MIRU-VNTR profiles is insufficient to establish concrete epidemiological relationships. In addition to patient demographics, clinical data is needed, which may require consideration of a mandatory reporting system for more assertive laboratory surveillance of *M. avium* disease.

Keywords: *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium avium*, MIRU-VNTR, Genotyping, Drug susceptibility testing, Laboratory Surveillance, Nontuberculous Mycobacteria, MNT.

Résumé

Introduction: Ces dernières années, les infections opportunistes par les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ont pris de l'importance pour la santé publique, *Mycobacterium avium* étant l'espèce la plus responsable de l'augmentation des cas de maladie chez l'homme. Actuellement, le mode de transmission n'est pas établi, mais l'exposition environnementale est considérée comme la principale source d'infection. Ainsi, des études épidémiologiques sont essentielles pour identifier les foyers d'infection potentiels et améliorer les méthodes de surveillance, de prévention et de contrôle de cette maladie.

Objectif de l'étude: Évaluation de la diversité génomique et du profil de résistance des isolats cliniques de *Mycobacterium avium* circulant au Portugal entre 2018 et 2022.

Méthodes: Entre 2018 et 2022, le Laboratoire National de Référence pour les Mycobactéries (LNR-TB) de l'INSA a reçu 103 isolats de *M. avium*. Parmi eux, un sous-ensemble de 42 souches a été caractérisé quant à leur diversité génomique grâce à la méthode de typage moléculaire MIRU-VNTR. De plus, des tests de susceptibilité phénotypique à la clarithromycine, à la moxifloxacine et au linézolide ont été réalisés sur 40 (95%) souches, ainsi que des tests de susceptibilité moléculaire en recherchant des mutations dans les gènes 16S rRNA (*rrs*) et 23S rRNA (*rpl*) associées à la résistance aux aminoglycosides (AG) et aux macrolides, respectivement.

Résultats: Les tests de susceptibilité phénotypique ont montré que 98% (39) des souches étaient sensibles à la clarithromycine, tandis qu'une faible proportion (25% et 27,5%) était sensible au linézolide et à la moxifloxacine. Une corrélation significative entre les résultats phénotypiques et génotypiques a été observée pour les macrolides. La méthode de typage moléculaire MIRU-VNTR a révélé une grande diversité génétique entre les souches, avec un indice discriminatoire de 0.9988. Ces résultats soulignent l'importance d'une surveillance continue des isolats cliniques de *Mycobacterium avium* pour mieux comprendre la résistance et améliorer les stratégies de gestion de cette maladie.

Conclusion: Bien que des groupes moléculaires aient été trouvés, l'analyse des profils MIRU-VNTR est insuffisante pour établir des relations épidémiologiques concrètes. Outre les données démographiques des patients, des données cliniques sont nécessaires, ce qui pourrait nécessiter une surveillance de laboratoire plus fiable de la maladie de *M. avium*.

Mots-clés: Complexe *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium avium*, MIRU-VNTR, *Génotypage*, Tests de sensibilité aux antimicrobiens, Surveillance en laboratoire, Mycobactéries non tuberculeuses, MNT.

Introdução

As infecções causadas por micobactérias têm-se revelado com importância crescente na saúde pública ao longo dos tempos, e doenças como lepra e tuberculose (TB) foram descritas há mais de 4000 e 9000 anos, respectivamente [1, 2]. Todavia, o género *Mycobacterium* foi apenas descrito pela primeira vez em 1874 por *Armauer Hansen*, e, só em 1896 o nome *Mycobacterium* foi estabelecido por *Lehmann* e *Neumann* [3]. Atualmente, existem mais de 250 espécies e subespécies conhecidas e identificadas como micobactérias na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*”, 2023 [4].

Apesar da TB continuar a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, com a diminuição dos casos da doença nos países mais desenvolvidos, as infecções oportunistas por micobactérias não tuberculosas (MNT), têm ganho uma importância crescente como um potencial problema de saúde pública [5–7]. As MNT são compostas por todas as espécies do género *Mycobacterium*, excluindo as espécies *M. leprae* e do complexo *M. tuberculosis*, sendo os organismos oportunistas do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) os principais responsáveis por infecções humanas [8].

As micobactérias são ubíquas na natureza e apresentam como principais reservatórios sistemas de água, solo e vegetação [9,10]. Porém, já foram isolados como contaminantes em carne para consumo humano [11–13], produtos lácteos [14, 15], frutas e vegetais [16]. Ao contrário de outras MNTs, não existem casos confirmados de infecções por MAC transmitidas entre humanos. Apesar de potencialmente zoonóticas [13, 17], acredita-se que as infecções humanas ocorrem essencialmente por exposição a fontes ambientais, por exemplo, através de ingestão ou inalação de água, partículas ou aerossóis contaminados [8]. Por terem um metabolismo aeróbico, estes microrganismos estabelecem-se na interface da água e do ar sendo facilmente aerossolizados de torneiras, chuveiros, piscinas, etc. Além disso, devido à composição rica em lípidos das suas membranas externas, estas bactérias são resistentes à desinfeção química por cloro, cloraminas, ozono e desinfetantes usados nos centros de tratamento de água, que acabam por eliminar a competição e selecionar MNTs [18].

No início da década de 1980, o complexo MAC era denominado MAI, e constituído pelas espécies *M.*

avium e *M. intracellulare* [8]. Recentemente, os avanços de análises genómicas permitiram a identificação e classificação de novas espécies e subespécies dentro deste complexo, ainda que, atualmente não haja concordância sobre esta taxonomia. Em 2018, *Jakko et al* [19] identificaram 12 espécies diferentes que assumiram ser do complexo MAC: *M. arosiense*, *M. bouchehurhonense*, *M. colombiense*, *M. lepraemurium*, *M. marseillense*, *Mycobacterium paraintracellulare*, *M. timonense*, *M. vulneris*, *M. yongonense*, *M. avium*, *M. chimaera* e *M. intracellulare*, sendo as três últimas as mais relevantes patogenicamente para o ser humano [8].

Adicionalmente, foram definidas quatro subespécies de *M. avium*: *M. avium subsp. avium* (MAA) e *M. avium subsp. silvaticum* (MAS) [20], frequentemente isoladas de aves, causando doenças respiratórias com sintomas semelhantes à tuberculose humana; *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP) [20] que afeta predominantemente animais ruminantes causando uma gastroenterite crónica, no entanto, apresenta um potencial carácter zoonótico, e tem sido associada na patogénese da doença de Crohn [21, 22], diabetes tipo 1 e esclerose múltipla [23] em humanos; e *M. avium subsp. hominissuis*, responsável pela maioria das infecções em humanos [24].

Apesar da exposição frequente a estas micobactérias, o desenvolvimento de doença por MAC em indivíduos imunocompetentes é incomum, sendo os mais suscetíveis os indivíduos com o sistema imunológico comprometido (como é o caso de doentes portadores do vírus da imunodeficiência humana e submetidos a transplante de órgãos) ou com outras patologias associadas, principalmente que debilizem o sistema respiratório (por exemplo, bronquiectasia) [8, 25]. Os casos geralmente apresentam-se como doença pulmonar crónica e de progressão lenta em indivíduos imunocompetentes, linfadenopatia periférica em crianças ou infeção disseminada em doentes imunocomprometidos. O diagnóstico clínico destas infecções é complexo dado que os sintomas iniciais na doença pulmonar são inespecíficos e incluem febre baixa, tosse crónica, fadiga/astenia, perda de peso, sudorese noturna e falta de ar [26]. No caso de uma infeção sistémica, vários órgãos, como o fígado, baço, gânglios linfáticos, medula óssea e intestinos, podem ser afetados e os sintomas incluem febre, anemia, dor abdominal e diarreia [25].

Devido ao carácter ubíquo destas micobactérias, o

isolamento microbiológico de MAC nem sempre é suficiente para estabelecer a sua associação como agente causador de doença, podendo tratar-se apenas de uma colonização. Por este motivo, a “*American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America*” definiu critérios de diagnóstico para orientar o clínico de forma que, o diagnóstico e consequentemente o início do tratamento seja o mais célere possível [27]. Atualmente, a terapêutica inclui o uso de múltiplos antibióticos sendo o esquema mais comum o que recorre ao uso de macrólidos em regime combinado com rifampicina e etambutol [28]. No entanto, em casos de infecção pulmonar grave ou de falências terapêuticas, é comum o uso de amicacina lipossômica (aminoglicosídeo) inalada, através de sistemas de nebulização [29].

Com o aumento de casos de doença por MAC em todo o mundo e, sendo os fatores ambientais a principal fonte de infecção, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos epidemiológicos para identificar possíveis focos de infecção relacionados e deste modo melhorar os métodos de vigilância, prevenção e controlo.

Com este objetivo, o uso de métodos de tipagem molecular e de caracterização fenotípica de suscetibilidade a antimicrobianos são frequentemente utilizados. Repetições em tandem de número variável de unidades repetitivas intercaladas (MIRU-VNTR – *Mycobacterial Interspersed repetitive units – Variable number of tandem repeats*) é um método de tipagem molecular baseado em PCR que envolve a análise de sequências de DNA repetitivas específicas no genoma micobacteriano. Sendo um método simples e rápido para discriminar isolados de espécies de *M. avium* [30], esta técnica pode permitir a identificação de possíveis clones ou agrupamentos de estirpes para uma melhor caracterização e deteção de padrões de transmissão [31, 32].

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da diversidade genómica e perfil de resistência de isolados clínicos de *Mycobacterium avium* circulantes em Portugal entre 2018 e 2022.

Métodos

No período entre 2018 e 2022, o Laboratório Nacional de Referência de Micobactérias (LNR-TB), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), recebeu 363 culturas positivas para MAC, das quais

103 (28%) foram identificadas como *M. avium* pelo kit GenoType Mycobacterium CM® (Hain Lifescience, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Devido às exigências nutricionais características da espécie em estudo e à taxa de crescimento lenta, não foi possível recuperar os 103 isolados. Adicionalmente, segundo resultados de WGS (*Whole Genome Sequencing*), obtidos no decurso de um trabalho laboratorial paralelo, apenas foram selecionados os isolados puros (isto é, sem contaminação por outros microrganismos ou casos de infecção mista). Assim, foram caracterizados 42 isolados (cerca de 41%), quanto à sua diversidade genómica e perfil de resistência.

Definição de caso

Os casos foram classificados apenas de acordo com os dados microbiológicos, uma vez que o LNR-TB não tem acesso aos dados clínicos: i) Caso definitivo – isolamento de MAC em duas ou mais amostras respiratórias ou isolamento de MAC numa amostra positiva colhida assepticamente (exemplo, biopsias, líquido cefalorraquidiano, lavados); ii) Caso possível – isolamento de MAC numa única amostra de natureza desconhecida; iii) Colonização – isolamento de MAC apenas numa amostra respiratória (ex.: expectoração, secreções brônquicas).

Extração/quantificação do ADN

O ADN micobacteriano foi extraído de culturas em meio sólido ou líquido de acordo com o procedimento descrito por van Soolingen *et al.* (2003) [33], com ligeiras alterações: i) após a adição de lisozima, as suspensões foram incubadas durante a noite a 37°C; ii) após adição da solução SDS/proteinase K, as suspensões foram incubadas a 65°C até completa dissolução.

O material genético extraído de alta qualidade foi posteriormente quantificado usando o equipamento Qubit (ThermoFisher, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

MIRU-VNTR

A genotipagem dos isolados de *M. avium* feita usando a metodologia previamente descrita por Thibault *et al.* (2007) [30], através da análise de oito *loci* MIRU-VNTR, sendo que as reações e condições de amplificação foram adaptadas com pequenos ajustes. Em

suma, as reações de amplificação para os VNTR 292, x3, 25, 47, 3 e 7, foram preparadas para um volume final de 25 µL compostas por: 1 U *Taq DNA polimerase* (QIAGEN, Alemanha), 1 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs mix (Applied Biosystems, EUA), 5 µL de tampão 5x, 1 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 1,5 mM de MgCl₂ e 4 µL de DNA. As misturas de PCR dos VNTR 10 e 32 foram realizadas para um volume final de 25 µL, utilizando 1U da enzima KAPA (HiFi HotStart ReadyMix), 1 µM de cada primer e, 1 µL de DMSO. As temperaturas de *annealing* foram aumentadas um grau para aumentar a especificidade das reações de PCR. Os tamanhos dos fragmentos obtidos foram determinados automaticamente usando o *software* QIAxcel (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

A diversidade alélica (*h*) foi calculada de acordo com Selander *et al.* (1986) usando a seguinte fórmula: $h = 1 - \sum_{xi}^2 [\frac{N}{N-1}]$ onde N é o número total de estirpes e xi é a frequência do alelo i em cada *locus* [34]. O poder discriminatório do método foi calculado através da equação descrita por Hunter e Gaston (1988) (HGDI): Índice discriminatório (ID) = $|1 - [\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)]|$, onde N é o número total de estirpes, s é o número total de códigos MIRU-VNTR distintos determinados pelo método de tipagem, e nj é o número de estirpes pertencentes ao j-ésimo código [35].

As relações genéticas entre os isolados foram analisadas através da construção de uma *Minimum spanning Tree* (MST), na qual os perfis VNTR estão ligados entre si com a menor distância possível, recorrendo ao *software* *GrapeTree* (https://achtman-lab.github.io/GrapeTree/MSTree_holder.html).

Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)

O teste fenotípico de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado para 40 estirpes (95%), tendo sido testados os seguintes antibióticos: claritromicina (CLR), linezolid (LZD) e moxifloxacina [MXF], de acordo com o método de microdiluição e os critérios de resistência descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* [36].

Resumidamente, os inóculos foram preparados em meio *Mueller-Hinton* ajustado por catiões e suplemen-

tado com 5% de OADC. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) usadas para testagem foram: ≥ 32 µg/mL, 16 µg/mL and ≤ 8 µg/mL para a CLR e LZD; ≥ 4 µg/mL, 2 µg/mL e ≤ 1 µg/mL para a MXF.

Os tubos foram incubados a 37°C durante sete dias e o crescimento no tubo de controlo validou a leitura da CMI. No caso de ausência de crescimento no controlo, as culturas foram reincubadas nas mesmas condições e a leitura repetida entre o 10º e o 14º dia.

Possíveis mutações nos genes 16S rRNA (*rrs*) e 23S rRNA (*rrl*), que estão associados a resistência a aminoglicosídeos e macrólidos, respetivamente [37, 38] foram avaliadas usando o kit GenoType NTM-DR® (Hain Lifescience, Alemanha) ou por sequenciação de Sanger. O alinhamento das sequências foi realizado no *software* MEGA versão 11 e no *software* online MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Resultados

Caracterização da amostragem em análise

Entre 2018 e 2022, o LNR-TB recebeu 363 amostras clínicas positivas para espécies pertencentes ao complexo MAC. Destas, 103 (28%) foram identificadas como *M. avium* pelo kit GenoType Mycobacterium CM® (Hain Lifescience, Alemanha) e correspondem a um total de 86 doentes (37 do sexo feminino, 49 do sexo masculino) com uma mediana de idades de 63 anos (Tab. 1).

Inicialmente, foram caracterizados 63 isolados, no entanto, no âmbito de um projeto mais abrangente do nosso laboratório, em que as mesmas amostras estavam a ser sequenciadas por WGS, 21 amostras foram excluídas do estudo devido a contaminações com outras micobactérias ou a infeções mistas. Assim sendo, neste estudo analisámos detalhadamente 42 estirpes identificadas como *M. avium*, isoladas a partir de amostras biológicas de 42 doentes distintos (23 do sexo feminino, 19 do sexo masculino) com uma mediana de idades de 61 anos. Os casos de doença eram predominantemente de doentes residentes na Área Metropolitana de Lisboa (AML) (22 casos; 52%), seguida da região Norte (11 casos; 26%) e Centro (5 casos; 12%). Os restantes quatro casos distribuíram-se pelo Alentejo, Algarve e a Região Autónoma dos Açores, sendo que um tem localização desconhecida (Tab. 1).

Tabela 1: Caracterização da amostragem por região de residência, sexo e idade dos doentes

	Sexo	N.º casos	Mediana de idade	Média de idade
AML	F	12	65.5 ± 22.45	57.58 ± 22.45
	M	10	57 ± 14.96	57.20 ± 14.96
Norte	F	4	57 ± 9.52	61,00 ± 9.52
	M	7	64 ± 9.66	65.29 ± 9.66
Centro	F	4	59 ± 11.24	55 ± 11.24
	M	1	57.25 ± 11.24	Na
Alentejo	F	-	-	-
	M	1	83	Na
Algarve	F	1	63	Na
	M	-	-	-
RAA	F	1	20	Na
	M	-	-	-
Total	F	22	59.5 ± 19.11	56.68 ± 19.11
	M	19	64 ± 13.67	63.63 ± 13.67

AML - Área Metropolitana de Lisboa; RAA - Região Autónoma dos Açores; F - sexo feminino; M - sexo masculino e Na - Não aplicável

Usando os critérios descritos na secção de métodos, 11 (26%) dos casos foram classificados como “caso definitivo”, 18 (43%) como “caso possível” e 13 (31%) como “colonização”.

Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de suscetibilidade fenotípica revelaram que 98% (n=39) das estirpes estudadas

são suscetíveis à claritromicina, enquanto 2% (n=1) foram classificadas como estirpes com resistência intermédia (Fig. 1). Relativamente ao linezolid, 25% (n=10) dos isolados demonstraram suscetibilidade, 35% (n=14) apresentaram um fenótipo intermédio e 40% (n=16) foram considerados resistentes (Fig. 1). Em relação à moxifloxacina, 30% (n=12) das estirpes foram consideradas suscetíveis, 27,5% (n=11) mostraram fenótipo intermédio e 42,5% (n=17) foram

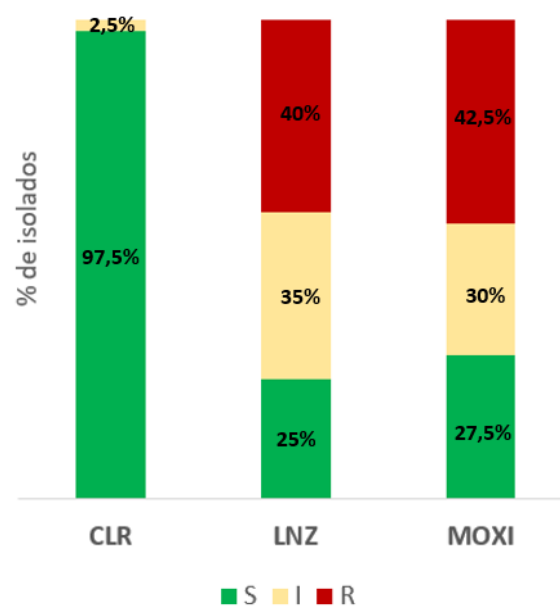


Figura 1: Perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos 40 isolados de *M. avium* estudados
CLR - Claritromicina; LNZ - Linezolid; MOXI - Moxifloxacina; S - Suscetível; I - Intermédio e R - Resistente

classificadas como resistentes (Fig. 1).

A análise molecular, revelou que 100% das estirpes em estudo são *wild type* para o gene *rrl*, e por isso presumivelmente suscetíveis aos macrólidos. Da mesma forma, 98% serão suscetíveis para os AG (não houve amplificação do gene *rrs* numa amostra). Curiosamente, quatro estirpes apresentaram uma população heterogênea G1491G/A, mutação que ainda não está descrita em *M. avium* como eventual marcador de resistência.

Genotipagem por MIRU-VNTR

Usando como *threshold* a diferença de um *locus* entre estirpes, a técnica de MIRU-VNTR permitiu a detecção de dois clusters moleculares, com dois e três isolados, e 37 singletons (Fig. 2 A). Usando uma diferença de dois *loci* detetaram-se oito clusters moleculares, compostos por dois a quatro isolados, e 20 singletons (Fig. 2 B).

Foram identificados 41 perfis MIRU-VNTR distintos, com apenas duas estirpes apresentando o mesmo perfil. Através da plataforma online “MAC-INMV-SSR Database” (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>) foi possível classificar dois perfis VNTR, INMV 4- *M. avium paratuberculosis* (PTNTM_12) e INMV 92- *M. avium hominissuis*. (PTNTM_03).

A maioria dos *loci* caracterizados foram amplificados com sucesso, com exceção de dois isolados nos VNTR 10, 7 e três isolados no VNTR 32 (Tabela 2). Em termos de diversidade alélica (*h*), os VNTR 3 e 7 foram os mais homogêneos, com a maioria dos isolados a apresentar duas unidades repetitivas. Os restantes *loci* demonstraram um forte poder de discriminatório (Tab. 2). No global, a metodologia MIRU-VNTR obteve um índice discriminatório de 0.9988.

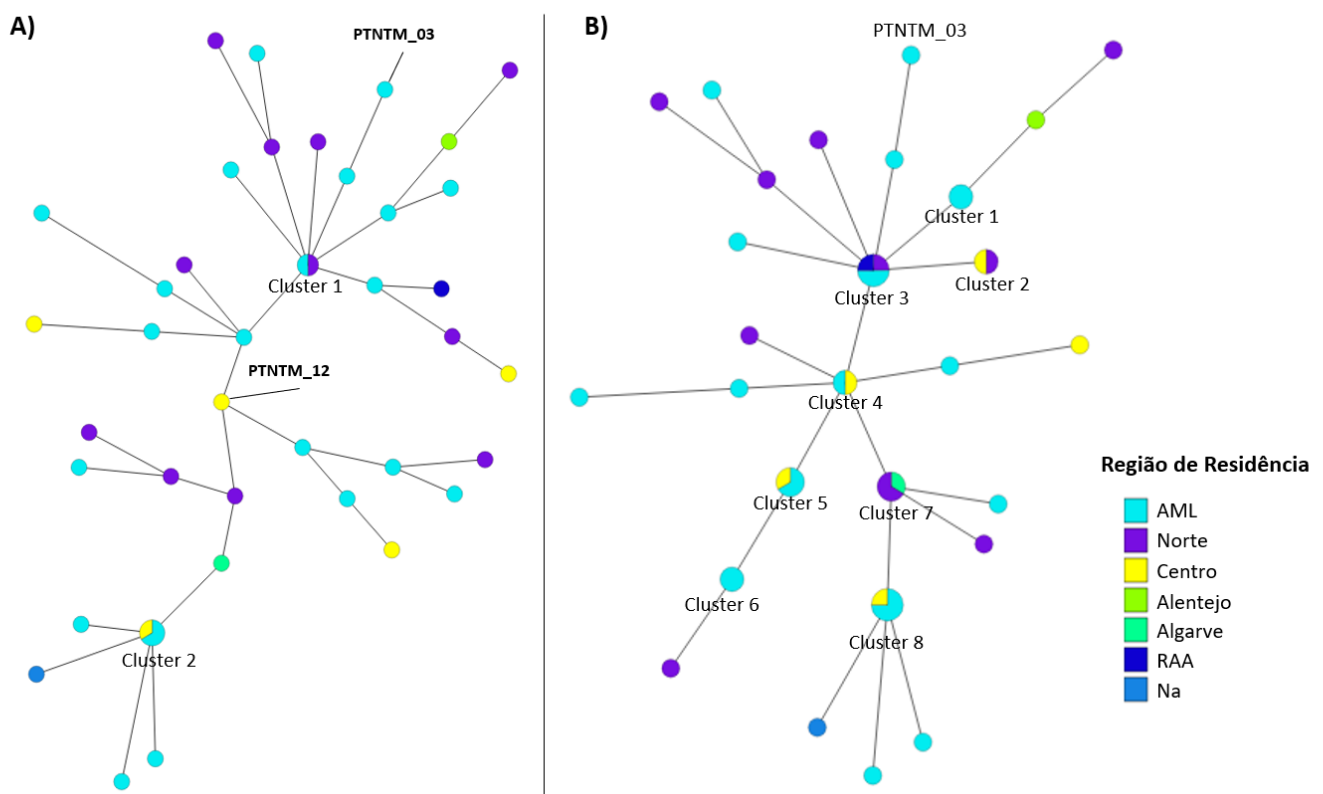


Figura 2: Distribuição geográfica dos 42 isolados clínicos de *M. avium*. MST mostrando as relações genéticas entre os isolados, em que todos os perfis VNTR estão agrupados considerando a permissão de diferença de (A) 1 locus e (B) de 2 loci

Tabela 2: Distribuição alélica entre os isolados de *M. avium* determinada por tipagem MIRU-VNTR e cálculo do poder discriminatório para cada um dos loci

Locus	Número de isolados com um número de cópias TR específico												Na*	h**	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
292	16	3	12	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.85
x3	0	10	8	14	3	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0.88
25	1	0	11	20	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.82
47	0	3	5	19	10	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0.85
3	0	10	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.75
10	1	12	16	1	3	6	1	0	0	0	0	0	2	0	0.86
7	1	5	25	8	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0.78
32	0	0	0	0	0	2	1	2	19	10	5	0	3	0	0.85

*Na: Não amplificou.

**h: Distribuição alélica calculada como descrito anteriormente.

Discussão

À medida que as espécies MAC são reconhecidas como agentes patogênicos cada vez mais significativos, aumenta a importância do estudo da sua diversidade genética e dinâmica de transmissão em termos de saúde pública. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu na caracterização da diversidade genética e do perfil de resistência de isolados clínicos de *M. avium* circulantes em Portugal entre 2018 e 2022.

Os 42 isolados (41%) caracterizados, correspondem a doentes distintos, maioria mulheres, com uma mediana de idade de $61 \pm 16,78$ anos, o que está de acordo com estudos anteriores sobre a prevalência desta doença que afeta principalmente indivíduos do sexo feminino com idade superior a 65 anos [40, 41]. Estes pacientes residem maioritariamente na AML (52%), Norte (26%) e Centro (12%). Embora estudos anteriores tenham demonstrado uma maior prevalência de casos de micobacterioses na região AML [41, 42], não podemos deixar de referir que a nossa amostra pode estar enviesada, sobre representando amostras isoladas de doentes da grande Lisboa, dado ser a região com maior densidade populacional e ser a principal área que o LNR-TB cobre para diagnóstico.

Adicionalmente, a dificuldade na classificação do caso e a sua relevância clínica para o doente tornam as infeções por *M. avium* um potencial problema de saúde pública emergente. Somente uma análise conjunta dos dados laboratoriais e dos dados clínicos (exames radiológicos, sintomas, despistes de outras doenças) vão permitir esclarecer totalmente o caso. Não sendo uma doença de notificação clínica obrigatória e não

tendo o LNR-TB acesso a dados clínicos da maioria dos doentes, a classificação de cada um dos casos analisados no presente trabalho foi baseada apenas em dados microbiológicos. Desta forma, apenas 26% foram considerados “casos definitivos”, 43% foram classificados como “caso possível” e 31% como “colonização”. Importa, no entanto, realçar que, com acesso a informação clínica, muito dos casos possíveis e de colonização poderiam ser reclassificados como definitivos.

Nos estudos de suscetibilidade fenotípica, a claritromicina foi o antibiótico com maior eficácia *in vitro*, uma vez que nenhuma estirpe apresentou um fenótipo resistente (Fig. 1). Por outro lado, apenas 25% e 27,5% das estirpes foram suscetíveis ao linezolid e moxifloxacina, respetivamente (Fig. 1). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores [43] e são significativos, uma vez que, os macrólidos (claritromicina e azitromicina) são a classe de antibióticos mais eficaz no tratamento de micobacterioses por MAC, em que o regime combinado com outros fármacos tem o propósito de evitar o desenvolvimento de resistência [44–46].

Os testes genotípicos de suscetibilidade revelaram concordância absoluta com os fenótipos em relação a macrólidos. Além disso testou-se mais uma classe de antibióticos, os aminoglicosídeos. As espécies MAC, além de crescimento lento, são bastante exigentes nutricionalmente, o que torna a realização de testes fenotípicos um desafio. Devido ao tempo de crescimento e períodos de incubação, os TSA podem demorar semanas até à emissão final do resultado. Além disso, a interpretação dos resultados é subjetiva e a análise automatizada ainda não está pronta para uso clínico

de rotina [47]. Posto isto, o kit GenoType NTM-DR oferece resultados rápidos e precisos, num curto período de tempo, permitindo guiar a terapêutica antecipadamente. Contudo, a melhor prática é que estes resultados sejam acompanhados de testes fenotípicos de forma a obter um quadro mais completo do comportamento destes microrganismos, incluindo a deteção de presença de mecanismos de resistência não analisadas nos testes genéticos [48].

Curiosamente, na análise molecular do gene *rrs* (16S), quatro estirpes apresentaram uma população heterogênea G1491G/A, mutação que ainda não está descrita em *M. avium*. Estudos em outros microrganismos descrevem que alterações de base nucleotídica na posição 1491 do gene 16S rRNA, altamente conservado, destabiliza a sua estrutura com possível consequência no fenótipo aos AG [49]. Ensaios de mutagénese identificaram a mutação G1491A como responsável pela resistência a vários antibióticos desta classe. Inicialmente foi identificada em mutantes mitocondriais de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* [50], *Tetrahymena thermophila* [51] e de *Thermus thermophilus* [52] resistentes à paromomicina. Adicionalmente, em *M. segmatis* foi associada a uma resistência baixa à amicacina, canamicina [53] e viomicina [54]. Para esclarecer o efeito desta mutação em estirpes de *M. avium*, serão necessários ensaios de mutagénese para avaliar as diferenças nos fenótipos aos AG sendo que, neste momento, a sua deteção apenas permite especular sobre um potencial surgimento de resistência.

A metodologia MIRU-VNTR é uma das principais técnicas de genotipagem de *M. avium* utilizada em estudos epidemiológicos e de vigilância de casos [30, 32, 55–57]. Tal como observado em estudos anteriores, a genotipagem por MIRU-VNTR permitiu verificar que existe uma grande diversidade genética entre as estirpes (Fig. 2) [55, 56]. Se considerarmos a permissão de um *locus* de diferença, agrupamos as estirpes em dois clusters moleculares, com dois e três isolados. Por outro lado, com um *threshold* de dois *loci* as estirpes são agrupadas/associadas em oito clusters moleculares, compostos por dois a quatro isolados. Neste estudo a técnica obteve um índice discriminatório de 0.9988, no entanto, ainda que alguns clusters sejam formados por estirpes da mesma região geográfica, o LNR-TB não tem acesso a dados demográficos e clínicos que sustentem os resultados dos MIRUs. Desta forma, consideramos que neste estudo, a análise única dos perfis de MIRU-VNTR

não é suficiente para permitir estabelecer relações epidemiológicas concretas.

Uma vez mais, e tendo em consideração o aumento de casos de infeção e doença por *M. avium*, que ainda não é de notificação obrigatória, recomenda-se o fortalecimento dos sistemas de vigilância promovendo a articulação entre o laboratório e os serviços de saúde pública para que se consigam identificar potenciais nichos infecciosos e, eventualmente, prever o aparecimento de novos casos. Considerando que estes microrganismos são oportunistas e amplamente disseminados no ambiente, a identificação laboratorial na ausência de dados clínicos do paciente, torna muito difícil diferenciar uma possível contaminação da amostra de uma doença confirmada.

Ainda que o modo de transmissão de infeções humanas não esteja totalmente esclarecido, uma vez que as espécies MAC são ubíquas no meio ambiente, estas estão essencialmente associadas a contaminação ambiental [5]. Assim sendo, são também fundamentais estudos futuros que analisem amostras ambientais em áreas de maior prevalência da doença, para, comparando com amostras clínicas dos doentes, identificar possível proximidade genética e deste modo promover uma eventual descontaminação ou outras intervenções para a eliminação destes microrganismos no ambiente.

Conclusão

Os estudos epidemiológicos desempenham um papel fundamental na compreensão da distribuição global das espécies MAC. Contudo, a fiabilidade destes estudos depende de dados demográficos e clínicos. De forma a que sejam gerados dados mais precisos sobre valores de prevalência e incidência desta doença é necessário repensar a obrigatoriedade de notificação da doença e vigilância laboratorial, bem como promover uma melhor articulação entre os dados laboratoriais e de saúde pública.

Aprovação por comité de ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse relacionados com o presente artigo.

Bibliografia

- [1] World Health Organization (WHO). World Leprosy Day 2023 [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 17]. Available from: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2023/01/29/default-calendar/act-now-end-leprosy-wld-2023>
- [2] Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY-C, Gernaey AM, et al. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE* [Internet]. 2008;3(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2565837/>
- [3] Tortoli E. The Taxonomy of the Genus Mycobacterium. In: *Nontuberculous Mycobacteria [NTM]: Microbiological, Clinical and Geographical Distribution*. 2019.
- [4] Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M. TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D801-D807. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
- [5] Kaczmarska A, Didkowska A, Kwiecień E, Stefanska I, Rzewuska M, Anusz K. The Mycobacterium avium complex – an underestimated threat to humans and animals. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2022;29(1).
- [6] Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Ångeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal*. 2013;42(6).
- [7] Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2014;18(11):1370–7. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0120>
- [8] Daley CL. Mycobacterium avium Complex Disease. *American Society for Microbiology* [Internet]. 2017;32[Supplement 2]:U1–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.TNM17-0045-2017>
- [9] Honda JR, Viridi R, Chan ED. Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2029. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02029>
- [10] Whiley H, Keegan A, Giglio S, Bentham R. Mycobacterium avium complex - the role of potable water in disease transmission. *Journal of Applied Microbiology* [Internet]. 2012;113(2):223–32. Available from: <https://slamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2012.05298>
- [11] Klanicova B, Slana I, Vondruskova H, Kaevska M, Pavlik I. Real-Time Quantitative PCR Detection of Mycobacterium avium Subspecies in Meat Products. *Journal of Food Protection*. 2011;74(4):636–40
- [12] Gill CO, Saucier L, Meadus WJ. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Dairy Products, Meat, and Drinking Water†. *Journal of Food Protection*. 2011;74(3):480–99.
- [13] Eslami M, Shafiei M, Ghasemian A, Valizadeh S, Al-Marzoqi AH, Shokouhi Mostafavi SK, et al. Mycobacterium avium paratuberculosis and Mycobacterium avium complex and related subspecies as causative agents of zoonotic and occupational diseases. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(8):12415–21.
- [14] Sevilla IA, Molina E, Tello M, Elguezabal N, Juste RA, Garrido JM. Detection of Mycobacteria by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets. 2017;8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01030>
- [15] Sgarioni SA, Hirata RDC, Hiroyuki Hirata M, Leite CQF, de Prince KA, Leite SR de A, et al. Occurrence of Mycobacterium bovis and non-tuberculous mycobacteria [NTM] in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45(2).
- [16] Dziejzinska R, Makovcova J, Kaevska M, Slany M, Babak V, Moravkova M. Nontuberculous mycobacteria on ready-to-eat, raw and frozen fruits and vegetables. *J Food Prot*. 2016;79(8).
- [17] Waddell LA, Rajic A, Stärk KDC, McEWEN SA. The zoonotic potential of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiology and Infection* [Internet]. 2015;143(15):3135–57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25989710/>
- [18] Taylor RH, Falkingham JO, Norton CD, LeChevallier MW. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(4):1702–5.
- [19] Van Ingen J, Turenne CY, Tortoli E, Wallace RJ, Brown-Elliott BA. A definition of the Mycobacterium avium complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(11)
- [20] Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of Mycobacterium avium, and description of Mycobacterium avium subsp. avium subsp. nov., Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis subsp. nov., and Mycobacterium avium subsp. silvaticum subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1990;40(3)
- [21] Bach H. What Role Does Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Play in Crohn's Disease? *Current Infectious Disease Reports*. 2015;17(2):463. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11908-015-0463-z>
- [22] Timms VJ, Daskalopoulos G, Mitchell HM, Neilan BA. The association of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2016;11(2).
- [23] Ekundayo TC, Falade AO, Igere BE, Iwu CD, Adewoyin MA, Olasehinde TA, et al. Systematic and meta-analysis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis related type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep*. 2022;12(1).
- [24] Mijs W, de Haas P, Rossau R, Van Der Laan T, Rigouts L, Portaels F, et al. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation Mycobacterium avium subsp. avium for bird-type isolates and “M. avium subsp. hominissuis” for the human/porcine type of M. avium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52(5).
- [25] Heidary M, Nasiri MJ, Mirsaedi M, Jazi FM, Khoshnood S, Drancourt M, et al. Mycobacterium avium complex infection in patients with human immunodeficiency virus: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;234(7):9994–10001
- [26] To K, Cao R, Yegiazaryan A, Owens J, Venketaraman V. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(8):2541
- [27] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(4):367–416
- [28] Corrigendum to: Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(11):3023; DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cia1062>
- [29] Griffith DE, Eagle G, Thomson R, Aksamit TR, Hasegawa N, Morimoto K, et al. Amikacin liposome inhalation suspension for treatment-refractory lung disease caused by Mycobacterium avium complex [CONVERT] a prospective, open-label, randomized study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(12).
- [30] Thibault VC, Grayon M, Boschiroli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and M. avium strains: Comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8).
- [31] Biet F, Sevilla IA, Cochard T, Lefrançois LH, Garrido JM, Heron I, et al. Inter- and Intra-subtype genotypic differences that differentiate Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis strains. *BMC Microbiol*. 2012;12.
- [32] Inagaki T, Nishimori K, Yagi T, Ichikawa K, Moriyama M, Nakagawa T, et al. Comparison of a variable-number tandem-repeat [VNTR] method for typing Mycobacterium avium with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7).
- [33] van Soolingen D, de Haas PEW, Kremer K. Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of Mycobacteria. In: *Mycobacterium Tuberculosis Protocols*. 2003.
- [34] Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. 1986;51(5):873–84.
- [35] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*. 1988;26(11).
- [36] Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, et al. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes [Internet]. 2nd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31339680/>
- [37] Kim SY, Kim DH, Moon SM, Song JY, Huh HJ, Lee NY, et al. Association between 16S rRNA gene mutations and susceptibility to amikacin in Mycobacterium avium Complex and Mycobacterium abscessus clinical isolates. *Sci Rep*. 2021;11(1).
- [38] Mougari F, Loiseau J, Veziris N, Bernard C, Bercot B, Sougakoff W, et al. Evaluation of the new GenoType NTM-DR kit for the molecular detection of antimicrobial resistance in non-tuberculous mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(6).
- [39] Cochard T, Branger M, Supply P, Sreevatsan S, Biet F. MAC-INMV-SSR: a web application dedicated to genotyping members of Mycobacterium avium complex [MAC] including Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;77
- [40] Mehdi Mirsaedi, Sadikot RT. Gender susceptibility to mycobacterial infections in patients with non-CF bronchiectasis. *Int J Mycobacteriol*. 2015;4(2):92–6.

- [41] Oliveira MJ, Gaio AR, Gomes M, Gonçalves A, Duarte R. Mycobacterium avium infection in Portugal. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2017;21(2)
- [42] Santos A, Carneiro S, Silva A, Gomes JP, Macedo R. Nontuberculous Mycobacteria in Portugal: Trends from the last decade. *Pulmonology*. 2022
- [43] Wetzstein N, Kohl TA, Andres S, Schultze TG, Geil A, Kim E, et al. Comparative analysis of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility patterns in Mycobacterium avium complex. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;93
- [44] Morimoto K, Namkoong H, Hasegawa N, Nakagawa T, Morino E, Shiraishi Y, et al. Macrolide-resistant mycobacterium avium complex lung disease: Analysis of 102 consecutive cases. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(11)
- [45] Field SK, Cowie RL. Treatment of Mycobacterium avium-intracellulare complex Lung Disease with a Macrolide, Ethambutol, and Clofazimine. *Chest*. 2003;124(4)
- [46] Kwon YS, Koh WJ, Daley CL. Treatment of Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases [Internet]*. 2019;82(1):15–26
- [47] Rockland M, Ruth MM, Aalders N, Pennings L, Hoefsloot W, Wattenberg M, et al. Implementation of semiautomated antimicrobial susceptibility interpretation hardware for nontuberculous mycobacteria may overestimate susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2018;57(4)
- [48] Huh HJ, Kim SY, Shim HJ, Kim DH, Yoo IY, Kang OK, et al. GenoType NTM-DR Performance Evaluation for Identification of Mycobacterium avium Complex and Mycobacterium abscessus and Determination of Clarithromycin and Amikacin Resistance. *J Clin Microbiol*. 2019;57(8)
- [49] Pfister P, Hobbie S, Brüll C, Corti N, Vasella A, Westhof E, et al. Mutagenesis of 16 S rRNA C1409-G1491 base-pair differentiates between 6'OH and 6'NH3+ aminoglycosides. *J Mol Biol*. 2005;346(2)
- [50] Li M, Tzagoloff A. Identification of the paromomycin-resistance mutation in the 15 S rRNA gene of yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(10)
- [51] Spangler EA, Blackburn EH. The nucleotide sequence of the 17S ribosomal RNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of point mutations resulting in resistance to the antibiotics paromomycin and hygromycin. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(10):6334–40
- [52] Gregory ST, Carr JF, Rodriguez-Correa D, Dahlberg AE. Mutational analysis of 16S and 23S rRNA genes of *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol*. 2005;187(14)
- [53] Shcherbakov D, Akbergenov R, Matt T, Sander P, Andersson DI, Böttger EC. Directed mutagenesis of mycobacterium smegmatis 16S rRNA to reconstruct the in vivo evolution of aminoglycoside resistance in mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*. 2010;77(4)
- [54] Taniguchi H, Chang B, Abe C, Nikaido Y, Mizuguchi Y, Yoshida SI. Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J Bacteriol*. 1997;179(15)
- [55] Radomski N, Thibault VC, Karoui C, De Cruz K, Cochard T, Gutiérrez C, et al. Determination of genotypic diversity of mycobacterium avium subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandemrepeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4)
- [56] Imperiale BR, Moyano RD, Di Giulio AB, Romero MA, Alvarado Pinedo MF, Santangelo MP, et al. Genetic diversity of Mycobacterium avium complex strains isolated in Argentina by MIRU-VNTR. *Epidemiol Infect*. 2017;145(7)
- [57] Shin JI, Shin SJ, Shin MK. Differential Genotyping of Mycobacterium avium Complex and Its Implications in Clinical and Environmental Epidemiology. *Microorganisms*. 2020 Jan 10;8(1):98