

# Comparación y evaluación de métodos cuantitativos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas del complejo *Mycobacterium abscessus*

Comparison and Evaluation of Quantitative Methods for Determining Antimicrobial Susceptibility of Complex *Mycobacterium Abscessus* Strains

Comparaçã o e avaliaçã o de métodos cuantitativos para determinar a susceptibilidade antimicrobiana de cepas do complexo *Mycobacterium abscessus*

Ana Ramírez, MSc<sup>1</sup>;  
Nora Morcillo, PhD<sup>2</sup>;  
Belén Imperiale, PhD<sup>3</sup>;  
María Araque, PhD<sup>1</sup>;  
Jacobus H de Waard, PhD<sup>4</sup>

**Recibido:** 31 de enero del 2017 / **Aprobado:** 19 de septiembre del 2017

**Doi:** <http://dx.doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.6491>

**Para citar este artículo:** Ramírez A, Morcillo N, Imperiale B, Araque M, de Waard JH. Comparación y evaluación de métodos cuantitativos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas del complejo *Mycobacterium abscessus*. Rev Cienc Salud. 2018;16(1):69-81. Doi: <http://dx.doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.6491>

- 1 Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
  - 2 Hospital Dr. Antonio A. Cetrángolo, Laboratorio de Referencia del Programa de Control de la Tuberculosis de la Provincia de Buenos Aires.
  - 3 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto de Biotecnología, Castelar, Buenos Aires, Argentina.
  - 4 Universidad Central de Venezuela Laboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina, San José, Caracas, Venezuela.
- \* Autora responsable de la correspondencia. Correo electrónico: [ramirezana@ula.ve](mailto:ramirezana@ula.ve)

## Resumen

**Introducción:** el complejo *Mycobacterium abscessus* incluye especies patógenas emergentes multirresistentes, lo cual limita las opciones terapéuticas para tratar las infecciones causadas por dichos microorganismos. En este estudio se compararon las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) obtenidas mediante dos métodos cuantitativos, se establecieron los puntos de corte empleados en el micrométodo colorimétrico (MMC) y se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana. **Materiales y métodos:** la CIM de nueve antibióticos fue determinada mediante el MMC y la microdilución en caldo (MDC) para 19 cepas del complejo *M. abscessus*. El test F de Snedecor se utilizó para establecer la diferencia significativa de las CIM entre los dos métodos y se determinaron los puntos de corte mediante la técnica de distribución de la probabilidad para el MMC. **Resultados:** se encontró una correlación de los resultados de la CIM del 50% entre MMC y MDC para los antibióticos ensayados. Probablemente esta discrepancia en los resultados se deba a diferencias en algunos parámetros técnicos de cada procedimiento. Todas las cepas fueron sensibles a la amikacina y resistentes a meropenem y ampicilina-sulbactam. Independientemente de la especie del complejo *M. abscessus*, las fluoroquinolonas mostraron una baja actividad inhibitoria (0-25%) sobre los aislados clínicos, resultados que son similares a los reportados por otros autores. **Conclusión:** Los patrones de multirresistencia observados en las cepas analizadas sugieren la necesidad de utilizar las pruebas de susceptibilidad como herramientas que permitan orientar y optimizar las conductas terapéuticas en infecciones producidas por *M. abscessus*.

**Palabras clave:** complejo *M. abscessus*, susceptibilidad antimicrobiana, micrométodo colorimétrico, microdilución en caldo, concentración mínima inhibitoria.

## Abstract

**Introduction:** The *Mycobacterium abscessus* complex includes multidrug resistant emerging pathogens, which limit therapeutic options for treating infections caused by these microorganisms. In this study, the minimum inhibitory concentrations (MICs) obtained by 2 quantitative methods were compared, the cut-off points used in the colorimetric micromethod (CMM) were established and the antimicrobial susceptibility was evaluated. **Materials and Methods:** The MIC for nine antibiotics was determined by CMM and broth microdilution (BMD) for 19 strains of *M. abscessus* complex. The Snedecor F test was used to establish the significant difference in the CIM between the methods, cutoff points were determined by the probability distribution method for the CMM. **Discussion:** A correlation of 50% between CMM and BMD for antibiotics tested was found. Probably, this discrepancy in the results is due to differences in some technical parameters of each procedure. All strains were susceptible to amikacin and were resistant to meropenem and ampicillin-sulbactam. Independently of the species of *M. abscessus* complex, fluoroquinolones showed a low inhibitory activity (0-25%) on clinical isolates, results that are similar to those reported by other authors. **Conclusion:** The Multidrug resistance patterns observed in the strains tested suggest the need for susceptibility testing as tools to guide and optimize the therapeutic behavior in infections caused by *M. abscessus*.

**Keywords:** *M. abscessus*, antimicrobial susceptibility, colorimetric micromethod, broth microdilution, minimum inhibitory concentration.

## Resumo

**Introdução:** o complexo *Mycobacterium abscessus* inclui espécies patógenas emergentes multirresistentes, o qual limita as opções terapêuticas para tratar as infecções causadas por estes microrganismos. Neste estudo compararam-se as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) obtidas mediante 2 métodos quantitativos, se estabeleceram os pontos de corte empregados no micrométodo colorimétrico (MMC) e se avaliou a susceptibilidade antimicrobiana. **Materiais e métodos:** a CIM de 9 antibióticos foi determinada mediante o MMC e microdiluição em caldo (MDC) para 19 cepas do complexo *M. abscessus*. O teste F de

Snedecor utilizou-se para estabelecer a diferença significativa das CIMs entre os dois métodos e determinaram-se os pontos de corte mediante a técnica de distribuição da probabilidade para o MMC. **Resultados:** se encontrou uma correlação dos resultados da CIM do 50% entre MMC e MDC para os antibióticos testados. Provavelmente, esta discrepância nos resultados se deve a diferenças em alguns parâmetros técnicos de cada procedimento. Todas as cepas foram sensíveis à amikacina e resistentes a meropenem e ampicilina-sulbactam. Independentemente da espécie do complexo *M. abscessus*, as fluoroquinolonas mostraram uma baixa atividade inibitória (0-25%) sobre os isolados clínicos, resultados que são similares aos reportados por outros autores. **Conclusão:** Os padrões de multirresistência observados nas cepas analisadas, sugerem a necessidade de utilizar as provas de susceptibilidade como ferramentas que permitam orientar e otimizar as condutas terapêuticas em infecções produzidas por *M. abscessus*.

**Palavras-chave:** complexo *M. abscessus*, susceptibilidade antimicrobiana, micrométodo colorimétrico, microdiluição em caldo, concentração mínima inibitória.

## Introducción

El complejo *Mycobacterium abscessus* pertenece a las micobacterias de crecimiento rápido (MCR) que se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo y en el agua. En el 2011, el grupo *M. abscessus* fue subdividido en dos subespecies denominadas *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Sin embargo, recientemente análisis genéticos sugieren reorganizar taxonómicamente el grupo *M. abscessus* en tres genomoespecies: *M. abscessus*, *M. massiliense* y *M. bolletii* (1-5).

Desde el punto de vista clínico y epidemiológico, los miembros del complejo *M. abscessus* son considerados patógenos oportunistas emergentes que pueden causar infecciones pulmonares crónicas, de piel y tejidos blandos, huesos y articulaciones. Además, existen numerosos reportes donde estas micobacterias están involucradas en infecciones asociadas a traumas, cirugías y otros procedimientos como acupuntura, liposucción, mesoterapias, implantación de prótesis mamarias, entre otras. En Venezuela, se han registrado infecciones de piel y tejido blando asociadas con procesos cosméticos causadas por estos microorganismos (1, 2, 6-9).

El complejo *M. abscessus* se destaca por su elevada resistencia a los quimioterápicos antituberculosos y a la mayoría de los agentes antimicrobianos. Esta característica es principalmente atribuida a la estructura compleja e hidrofóbica de la pared celular y a la presencia de determinantes genéticos que codifican para diversos mecanismos de resistencia. Debido a esto, sería de utilidad realizar la prueba de susceptibilidad antimicrobiana como herramienta de orientación para el tratamiento. El método de microdilución en caldo (MDC), procedimiento de referencia recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), se realiza en microplacas con caldo de Müller-Hinton ajustado catiónicamente. Los antimicrobianos que se sugieren ensayar son: macrólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cefoxitina, imipenem, linezolid, tigeciclina, doxiciclina, minociclina y trimetoprima-sulfametoxazol. Las lecturas del MDC se realizan macroscópicamente determinando si hay o no crecimiento bacteriano dado por la presencia o ausencia de turbidez, respectivamente. Sin embargo, esta particularidad del método representa una desventaja, ya que el desarrollo de MCR no se

realiza de manera homogénea, lo cual dificulta la interpretación objetiva de la prueba. En consecuencia, han surgido como una alternativa los métodos colorimétricos, que incorporan indicadores de pH u óxido-reducción, los cuales permiten evidenciar fácilmente la presencia o no del crecimiento bacteriano mediante un cambio de color en el medio de cultivo. Uno de los indicadores de concentración de  $O_2$  más utilizado es la resazurina, una oxazona que en estado oxidado es de color azul y por acción de las oxidorreductasas producidas por las bacterias viables es reducida de forma irreversible a resorufina, un compuesto de color fucsia. Así, los microorganismos sensibles que son inhibidos por los antibióticos no producirán el viraje del indicador, manteniéndose la resazurina en su estado oxidado (azul). El micrométodo colorimétrico (MMC) ha sido ampliamente utilizado para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por concentración inhibitoria mínima ( $C_{IM}$ ) en *M. tuberculosis*, pero su uso en MCR no ha sido estandarizado (2, 10-12, 13-17).

El tratamiento de las infecciones producidas por MCR no está claramente establecido y, por lo general, difiere de las conductas terapéuticas de otras microbacteriosis, así como de la indicada en los casos de tuberculosis. Por otra parte, las distintas especies que conforman el complejo *M. abscessus* fenotípicamente presentan perfiles de susceptibilidad variable a los antimicrobianos de uso habitual en la práctica clínica. Por consiguiente, existe la necesidad de caracterizar correctamente cada aislamiento clínico y realizar estudios de susceptibilidad en todos los casos con el fin de orientar la elección del antibiótico y monitorear la aparición de mutantes resistentes durante el tratamiento, lo cual puede ocurrir durante la terapia prolongada (1, 2, 10).

Con base en lo descrito, los objetivos de este estudio fueron comparar las  $C_{IM}$  obtenidas mediante los métodos cuantitativos MMC y MDC en especies del complejo *M. abscessus* de origen clínico, establecer los puntos de corte empleados en el MMC y determinar la susceptibilidad antimicrobiana.

## Materiales y métodos

### Definición de términos

1. *Concentración inhibitoria mínima por el MMC.* Concentración mínima de antibiótico que previene el cambio de color del colorante vital resazurina (15, 16).
2. *Concentración inhibitoria mínima por el MDC.* Concentración mínima de antibiótico que impide el desarrollo bacteriano evidenciado por la turbidez del medio de cultivo (14).

### Cepas bacterianas empleadas en este estudio

Se estudiaron un total de 19 aislamientos clínicos del complejo *M. abscessus*, procedentes de cinco pacientes masculinos y 14 femeninos, en edades comprendidas entre 1 y 87 años, que fueron atendidos en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela, durante el periodo del 2004 al 2009. Las cepas se aislaron de diversas muestras

clínicas, seis de secreciones respiratorias (32%) y 13 de infecciones extrapulmonares (68%), asociadas principalmente a procedimientos cosméticos como mesoterapias, liposucciones e implantes quirúrgicos. Estas cepas fueron identificadas en un estudio previo como: 14, *M. abscessus*; 2, *M. bolletii*; y 3, *M. massiliense*, mediante el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA, por sus siglas en inglés) y secuenciación del gen *erm41* (18-20).

## Antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad

Los antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad fueron: amikacina (AK; Sigma-Aldrich, USA); cefoxitina (FOX, Sigma); linezolid (LNZ, USP); moxifloxacina (MXF; USP); imipenem (IMP; USP) y ciprofloxacina (CIP; USP). Además de estos antibióticos, recomendados por el CLSI, también se incluyeron ampicilina-sulbactam (SAM; Laboratorios Richet, S.A., Argentina), meropenem (MEM; USP) y levofloxacina (LVX; USP). Los intervalos de las concentraciones de los antibióticos utilizados se especifican en la tabla 1. Para estos ensayos se usaron como cepas control *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *M. peregrinum* ATCC 700686. La susceptibilidad a la claritromicina en estos aislados clínicos fue determinada en un estudio previo (14, 18).

**Tabla 1.** Intervalos de concentración de los antibióticos según el método utilizado

Antibióticos	Rangos de concentración de los antibióticos (µg/mL)	
	MMC <sup>a</sup>	MDC <sup>b</sup>
AK	0,50-32	0,25-256
FOX	13-128	0,1-128
SAM	1/0,50-128/64	1/0,5-128/64
MEM	0,06-64	0,06-64
IMP	0,06-64	ND
LNZ	2-128	0,06-64
MXF	0,06-8	0,01-8
LVX	0,25-16	0,0015-16
CIP	0,01-8	0,01-8

<sup>a</sup> Intervalos establecidos en el Laboratorio de Referencia de Tuberculosis, Hospital Antonio Cetrángolo, Provincia de Buenos Aires, Argentina, para microbacterias no tuberculosas de crecimiento lento. <sup>b</sup> Intervalos establecidos en el CLSI (14). MMC: micrométodo colorimétrico; MDC: microdilución en caldo; AK: amikacina; SAM: ampicilina/sulbactam; FOX: cefoxitina; MEM: meropenem; LNZ: linezolid; MXF: moxifloxacina; LVX: levofloxacina; CIP: ciprofloxacina.

**Fuente:** elaboración propia

## Micrométodo colorimétrico

Esta prueba se realizó según la metodología previamente descrita, utilizando microplacas (96 pocillos; Falcon, BD Argentina) con caldo M7H9 (BBL, Cockeysville, Md, EEUU) suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC, del inglés *oleic acid, albumin, dextrose, catalase*. Becton Dickinson, Argentina) al 10% y realizando diluciones seriadas al doble para cada antibiótico. En todos los pozos, excepto en los controles negativos, se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:25 de la suspensión bacteriana con una turbidez comparable al estándar 1,0 de McFarland ( $10^6$ - $10^8$  UFC/mL). Las microplacas se incubaron durante 3 días a 37°C en cámara húmeda. Después de este periodo, en cada pozo se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de una solución de resazurina al 0,02% y las microplacas fueron reincubadas por 20 horas a 37°C (15, 16).

## Microdilución en caldo

Esta prueba se llevó a cabo siguiendo el procedimiento e interpretación descrito por el CLSI en el documento M24-A2. Los resultados de LVX fueron interpretados según los puntos de corte descritos por García-Martos y García-Agudo. Independientemente del método utilizado todas las lecturas que alcanzaron rangos inhibitorios expresados como “mayor que” (>) fueron considerados arbitrariamente inhibidos en la dilución inmediatamente superior. De igual forma, se procedió cuando las lecturas fueron expresadas “menor a” (<), la concentración inhibitoria se consideró en la dilución inmediatamente inferior (2, 14).

## Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante el software estadístico SPSS versión 17. Se utilizó el test F de Snedecor para establecer la diferencia significativa de las CIM entre los dos métodos (MMC y MDC) para cada antibiótico, usando como técnica de referencia el MDC. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

Adicionalmente, se procedió a determinar los puntos de corte para el MMC, utilizando el método de distribución de probabilidad. La sensibilidad, la especificidad y la precisión de la prueba para cada uno de los puntos de corte entre las categorías de interpretación sensibles-intermedias y resistentes se calcularon mediante el módulo de evaluación de pruebas diagnósticas del OpenEpi (21, 22).

## Resultados

La CIM fue determinada en 19 cepas del complejo *M. abscessus* contra ocho antibióticos (tabla 2), encontrando que los intervalos generales de inhibición para los antibióticos ensayados se ubicaron entre 2 a 32  $\mu\text{g/mL}$  por ambos métodos (MMC y MDC), excepto para SAM y AMX cuyos valores de CIM fueron superiores a 128  $\mu\text{g/mL}$  y 512  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Por otra parte, en la tabla 3 se muestra la diferencia significativa entre los resultados obtenidos empleando los dos métodos para cada antibiótico, mediante la estimación de

la diferencia del promedio de las CIM y los intervalos de confianza. El análisis permitió evidenciar que los valores de las CIM, conseguidos en cada una de las técnicas, para el 50% de los antibióticos ensayados tuvieron diferencias significativas, obteniendo una confiabilidad del 95%. El punto de corte óptimo fue calculado para los ocho antibióticos probados (tabla 3). El porcentaje de sensibilidad osciló entre el 14 y el 100%, la especificidad entre el 33 y el 83%, mientras que la precisión varió entre 26 y 100%.

**Tabla 2.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de 19 cepas de *M. abscessus* por MMC y MDC (CLSI) contra ocho agentes antimicrobianos

Antibiótico	Número de cepas distribuidas por CIM (µg/mL)													
	MMC/MDC													
	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
AK				2/1 <sup>b</sup>	2/1	1/4	4/7	5/3	5/3					
FOX						2 <sup>b</sup> /-		2/-		2/1	-/11	4/6	4/1 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup> /-
MEM*							1 <sup>b</sup> /-	2/-	1/-	-/3	3/5	9/9	2/1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> /-
LNZ	-/-	1/-	-/-	1/-	1/1	-/1	-/2	5/4	3/2	7/6	1/-	-/3 <sup>a</sup>		
MXF	3/-	6/-	-/-	4/-	2/3	3/3	-/1	1/5	-/7 <sup>a</sup>					
LVX	3 <sup>b</sup> /-	2/-	2/-	-/-	1/-	5/-	4/3	1/6	1 <sup>a</sup> /4	-/6 <sup>a</sup>				
CIP						-/3	5/7	10/4	2/5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> /-				
SAM									-/1			-/6	-/11 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup> /-

a Escalas mayor que (>) fueron convertidas en la concentración siguiente más alta.

b Escalas menores que (<) fueron convertidas en la concentración siguiente más baja.

\* n = 18 cepas; AK: amikacina; SAM: ampicilina/sulbactam; FOX: cefoxitina; MEM: meropenem; LNZ: linezolid; MXF: moxifloxacina; LVX: levofloxacina; CIP: ciprofloxacina.

**Tabla 3.** Comparación entre los métodos microdilución en caldo (µ1) y el micrométodo colorimétrico (µ2) y puntos de corte para el MMC

Antibiótico	Intervalo de confianza para la diferencia de medias	Valores de p	Punto de corte** (µg/mL)
AK	-0,88 < µ <sub>1</sub> - µ <sub>2</sub> < 5,38	0,12	ND
FOX	36,56 < µ <sub>1</sub> - µ <sub>2</sub> < 232,36	0,00*	≥512
MEM	-15,54 < µ <sub>1</sub> - µ <sub>2</sub> < 90,33	0,23	≥4
LNZ	-27,59 < µ <sub>1</sub> - µ <sub>2</sub> < 9,95	0,11	≥32
MXF	-9,86 < µ <sub>1</sub> - µ <sub>2</sub> < -4,91	0,00*	≥0,5
LVX	-19,13 < µ <sub>1</sub> - µ <sub>2</sub> < -9,91	0,00*	≥0,125
CIP	-0,97 < µ <sub>1</sub> - µ <sub>2</sub> < 6,98	0,14	≥8

\* p < 0,05 hay diferencias significativas, con un 95% de confianza. \*\* categoría resistente por el MMC.

AK: amikacina; SAM: ampicilina/sulbactam; FOX: cefoxitina; MEM: meropenem; LNZ: linezolid; MXF: moxifloxacina; LVX: levofloxacina; CIP: ciprofloxacina.

ND: no se determinaron. En el análisis estadístico no se incluyó SAM, debido a que no hubo variación de la CIM y por tal motivo no se puede asumir la medida como una variable aleatoria.

Los resultados de la interpretación de las pruebas de susceptibilidad por el método MDC de las 19 cepas del complejo *M. abscessus* se muestran en la tabla 4. Todas las cepas fueron sensibles a la AK, y resistentes al MEM y SAM. *M. bolletii* fue la especie que demostró la más amplia resistencia, siendo inhibida por un solo antibiótico (AK); de los nueve ensayados la sensibilidad intermedia solo fue observada con el IMP. Adicionalmente, se evidenció una pobre o nula actividad frente a las fluoroquinolonas y al linezolid sobre la colección de las cepas en estudio, oscilando los porcentajes de resistencia entre 35 y 100%.

**Tabla 4.** Interpretación de la susceptibilidad observada en las 19 cepas del complejo *M. abscessus* por el método de microdilución en caldo

Antibiótico	Número cepas (% resistencia)		
	<i>M. abscessus</i> n° 14	<i>M. bolletii</i> n° 2	<i>M. massiliense</i> n° 3
AK	0(0)	0(0)	0(0)
FOX	4(29)	2(100)	2(66)
MEM*	14(100)	2(100)	3(100)
IMP	1(7)	2(100)	0(0)
LNZ	6(43)	2(100)	1(33)
MXF	9(64)	2(100)	1(33)
LVX	12(86)	2(100)	2(66)
CIP	12(86)	2(100)	2(66)
SAM	14(100)	2(100)	3(100)

\* n = 18. Los puntos de corte para LVX fueron tomados de García-Martos y García Agudo (2).

AK: amikacina; SAM: ampicilina/sulbactam; FOX: cefoxitina; MEM: meropenem; LNZ: linezolid; MXF: moxifloxacina; LVX: levofloxacina; CIP: ciprofloxacina.

## Discusión

El tratamiento farmacológico de las enfermedades producidas por MCR es prolongado, costoso e incluye drogas con toxicidad generalmente mayor que los antibióticos de primera línea empleados en el tratamiento de la tuberculosis. En muchos casos la falla en la terapia antimicrobiana se debe a la elevada resistencia que presentan muchas de sus especies a los antituberculosos convencionales. Particularmente, los miembros del complejo *M. abscessus* presentan patrones de sensibilidad variable, razón por la cual se sugiere la identificación precisa de cada aislado clínico y la realización de pruebas de susceptibilidad *in vitro*. En vista de que no hay un consenso sobre las conductas terapéuticas para el manejo de las infecciones por MCR, las pruebas de susceptibilidad constituyen una herramienta necesaria para la orientación y el apoyo al decidir la antibióticoterapia más adecuada y eficaz según las características clínicas y epidemiológicas de cada caso (2, 10, 23).

En la actualidad, la técnica de MDC es considerada el procedimiento de referencia para determinar la sensibilidad de las MCR, siguiendo las recomendaciones del CLSI. Cuando un método diferente se postula para su implementación en los laboratorios clínicos, como ocurre en el caso de MMC, es necesario evaluar y demostrar si este funciona apropiadamente y si los resultados obtenidos son comparables con el método de referencia. Basándonos en los resultados obtenidos, se pudo evidenciar que el 50% de los antibióticos ensayados mostraron diferencias significativas entre ambos métodos. Probablemente, esta discrepancia en los resultados registrados para la CIM en el MDC y MMC se deba a diferencias en algunos parámetros técnicos de cada procedimiento, tales como: composición del medio de cultivo que cada método utiliza, concentración del inóculo, presencia o no de un indicador de crecimiento bacteriano y temperatura de incubación. En un estudio similar, Lavollay et al. compararon los resultados obtenidos de CIM en 43 aislados clínicos de *M. abscessus* con el método MDC utilizando dos medios de cultivo: caldo M7H9 suplementado OADC (10%)-tween-80 (0,05% v/v) y caldo Müeller-Hinton ajustado con cationes, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 10^{-4}$ , U-test Mann-Whitney) para IMP y FOX. Estos autores atribuyen dichas diferencias principalmente a la presencia del tween-80 en uno de los medios de cultivo utilizado, ya que este componente puede alterar la permeabilidad de la pared celular por su acción detergente y producir en las cepas estudiadas una falsa susceptibilidad a los antibióticos. Por el contrario, Li et al. sugieren que las pruebas de susceptibilidad realizadas a partir de micrométodos basados en caldo, como el desarrollado en placas de 96 pocillos con alamar azul, son comparables con el propuesto por el CLSI (14, 24-26).

Aunque algunos autores refieren que el MMC es un procedimiento confiable y de alta reproducibilidad para la determinación de la CIM de drogas antituberculosas en *M. tuberculosis*, en este estudio no fue apropiado extrapolar los criterios de interpretación del CLSI para calificar los datos arrojados por el MMC, por lo que fue necesario determinar los puntos de corte para cada antibiótico. Según los resultados obtenidos, se puede afirmar que, en este estudio, la confiabilidad del MMC para discriminar las cepas como verdaderamente sensibles o resistentes fue limitada. Los resultados obtenidos sugieren incrementar el número de cepas a estudiar, no solo de *M. abscessus* sino incorporando aquellas MCR de importancia y aislamiento clínico a fin de considerar una estandarización adecuada y una futura implementación en los laboratorios de diagnóstico (15-16).

La interpretación de las pruebas de susceptibilidad demostró que todas las cepas fueron sensibles a la AK al igual que en varios reportes previos. Sin embargo, Lee et al. encuentran una resistencia variable dependiendo de la especie: 6,03%, 12,38% y 100% para *M. massiliense*, *M. abscessus* y *M. bolletii*, respectivamente. En este estudio, 8 de las 14 cepas (57%) de *M. abscessus* fueron inhibidas por IMP. Por el contrario, Heidarieh et al. hallaron una sensibilidad para este antibiótico menor al 20% en cepas *M. abscessus* aisladas en varias regiones de Irán (10, 27-30).

Por otra parte, publicaciones previas muestran que las especies del complejo *M. abscessus* expresan una resistencia a FOX que oscila entre 1-7%, lo cual difiere con nuestros resultados, cuyo valor fue  $\geq 20\%$ . Esta discrepancia puede explicarse por la diferencia en la proporción de

las cepas incluidas en los estudios, así como a las variaciones en los patrones de susceptibilidad según las regiones geográficas (23, 24, 29).

En China, las fluoroquinolonas (LVX y CIP) son un grupo de antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de infecciones producidas por microbacterias no tuberculosas. No obstante, en este estudio la proporción de *M. abscessus* resistentes a estos antibióticos fue del 86% (12/14), 67% (2/3) en *M. massiliense* y 100% (2/2) en *M. bolletii*. Las posibles razones de esta alta resistencia pueden ser atribuidas al uso excesivo de LVX y CIP en la práctica clínica para otras enfermedades infecciosas, lo cual conlleva a una presión selectiva que resulta en la emergencia de mecanismos de resistencia, o que algunos aislados clínicos del complejo *M. abscessus* pueden ser naturalmente resistentes a estas fluoroquinolonas (23).

Linezolid y moxifloxacina son antibióticos que muestran elevada susceptibilidad *in vitro* contra *M. abscessus*. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio demuestran una débil actividad sobre las cepas estudiadas, la cual difiere de los resultados reportados en otros trabajos. Es probable que estas diferencias obedezcan a una dinámica epidemiológica local determinada por el origen de la cepa, la presión selectiva de los antibióticos en el momento de la recuperación de la cepa, así como todos aquellos factores que de alguna manera pudieran intervenir en la triada hospedero, microorganismo y ambiente (10, 13, 23, 26, 28, 29).

Los resultados obtenidos demostraron variaciones importantes de la susceptibilidad a los antibióticos entre las diferentes especies del complejo *M. abscessus*. Por lo tanto, se sugiere precisar la identificación de los aislados clínicos y realizar las pruebas de susceptibilidad como una herramienta ideal para orientar y optimizar las conductas terapéuticas en infecciones producidas por MCR. Por otra parte, a pesar de que una de las limitantes de este trabajo fue el bajo número de cepas analizadas, el MMC podría tener un valor potencial para evaluar la susceptibilidad de cepas de *M. abscessus*.

## Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no existe conflicto de intereses.

## Descargos de responsabilidad

Este trabajo fue financiado por proyecto ALFA Bacterialnet (Contrato II-531-FC-FA-FCD-FI). La determinación mediante el MMC fue realizada en el Laboratorio de Tuberculosis del Hospital Dr. Antonio Cetrángolo. Belen Imperiale es investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas —Conicet—, Argentina.

## Referencias

1. Petrini B. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *APMIS*. 2006;114:319-28. DOI: [10.1111/j.1600-0463.2006.apm\\_390.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_390.x)
2. García-Martos P, García-Agudo L. Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:192-200. DOI: [10.1016/j.eimc.2011.09.017](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.017)
3. Leao SC, Tortoli E, Euzéby JP, Garcia MJ. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011;61:2311-3. DOI: [10.1099/ijs.0.023770-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.023770-0)
4. Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics*. 2014;15:359. DOI: [10.1186/1471-2164-15-359](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-359)
5. Tan JL, Ngeow YF, Choo SW. Support from phylogenomic networks and subspecies signatures for separation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3042-6. DOI: [10.1128/JCM.00541-15](https://doi.org/10.1128/JCM.00541-15)
6. Alcaide F, Esteban J. Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(supl. 1):46-50. DOI: [10.1016/S0213-005X\(10\)70008-2](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70008-2)
7. Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez-Alfonzo R, Piquero J, et al. Infecciones en tejido blando debidas a micobacterias no tuberculosas posterior a mesoterapia. ¿Cuál es el precio de la belleza? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:302-6.
8. Da Mata O, Hernández-Pérez R, Corrales H, Cardoso-Leao S, de Waard J. Seguimiento de un brote de infección en tejido blando causado por *Mycobacterium abscessus* posterior a la mesoterapia en Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:596-601. DOI: [10.1016/j.eimc.2009.08.003](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.08.003)
9. Torres-Coy JA, Rodríguez-Castillo BA, Pérez-Alfonzo R, De Waard JH. Source investigation of two outbreaks of skin and soft tissue infection by *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in Venezuela. *Epidemiol Infect*. 2015;6:1-4. DOI: [10.1017/S0950268815002381](https://doi.org/10.1017/S0950268815002381)
10. Brown-Elliott B, Nash K, Wallace Jr R. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:545-82. DOI: [10.1128/CMR.05030-11](https://doi.org/10.1128/CMR.05030-11)
11. Nessar R, Cambau E, Reytrat J, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:810-8. DOI: [10.1093/jac/dkr578](https://doi.org/10.1093/jac/dkr578)
12. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PlosOne*. 2009;4:1-11. DOI: [10.1371/journal.pone.0005660](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005660)
13. Lee S, Kim J, Jeong J, Park Y, Bai G-H, Lee E, et al. Evaluation of the broth microdilution method using 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride for rapidly growing mycobacteria susceptibility testing. *J Korean Med Sci*. 2007;22:784-90. DOI: [10.3346/jkms.2007.22.5.784](https://doi.org/10.3346/jkms.2007.22.5.784)
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *nocardiae*, and other aerobic actinomycetes; approved standard. Document M24-A2. 2<sup>a</sup> ed. Wayne: CLSI; 2011.

15. Pontino MV, Di Giulio B, Fernández C, Imperiale B, Bodon A, Morcillo N. Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Arg Microbiol. 2006;38:145-51.
16. Morcillo N, Imperiale B, Di Giulio B. Evaluation of MGIT 960™ and the colorimetric-based method for tuberculosis drug susceptibility testing. Int J Tuberc Lung Dis. 2010;14(9):1169-75.
17. Escobar L, Rivera A, Aristizábal F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y mtt en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Vitae. 2010;17(1):67-74.
18. Ramírez A, de Waard J-H, Araque M. Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus* complex in clinical isolates from Venezuela. J Glob Antimicrob Resist. 2015;3:205-9. DOI: [10.1016/j.jgar.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.05.007)
19. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid Identification of mycobacteria to the species level by polimerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993;31:175-8.
20. Bastian S, Veziris N, Roux AL, Brossier F, Gaillard JL, Jarlier V, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rml* sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:775-81. DOI: [10.1128/AAC.00861-10](https://doi.org/10.1128/AAC.00861-10)
21. Begg CB. Evaluation of diagnostic test. En: Armitage P, Colton T, editores. Encyclopedia of biostatistics. 2ª ed. Chichester: John Wiley and Sons, Inc.; 2005.
22. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versión 3.0.3 [Internet]. [citado 2015 feb. 23]. Disponible en: <http://www.openepi.com>
23. Nie W, Duan H, Huang H, Lu Y, Bi D, Chu N. Species identification of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* using *rpoB* and *hsp65*, and susceptibility testing to eight antibiotics. Int J Infect Dis. 2014;25:170-4. DOI: [10.1016/j.ijid.2014.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.014)
24. Lavollay M, Dubée V, Heym B, Herrmann J-L, Gaillard J-L, Gutmann L, et al. *In vitro* activity of cefoxitin and imipenem against *Mycobacterium abscessus* complex. Clin Microbiol Infect. 2013;20:O297-300. DOI: [10.1111/1469-0691.12405](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12405)
25. Youmans AS, Youmans GP. The effect of 'Tween 80' in vitro on the bacteriostatic activity of twenty compounds for *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1948;56:245-52.
26. Li G, Lian L-l, Wan L, Zhang J, Zhao X, Jiang Y, et al. Antimicrobial susceptibility of standard strains of nontuberculous mycobacteria by microplate Alamar blue assay. PLoS ONE. 2013;8: e84065. DOI: [10.1371/journal.pone.0084065](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084065)
27. Set R, Rokade R, Agrawal S, Shastri J. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria by microdilution- Experience of a tertiary care centre. Indian J Med Microbiol. 2010;28:48-50. DOI: [10.4103/0255-0857.58729](https://doi.org/10.4103/0255-0857.58729)
28. Heidarieh P, Mirsaeidi M, Hashemzadeh M, Feizabadi MM, Bostanabad SZ, Ghalami Nobar M, et al. *In vitro* antimicrobial susceptibility of nontuberculous mycobacteria in Iran. Microb Drug Resist. 2016;22:172-8. DOI: [10.1089/mdr.2015.0134](https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0134)

29. Kim SY, Kim CK, Bae IK, Jeong SH, Yim JJ, Jung JY, et al. The drug susceptibility profile and inducible resistance to macrolides of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81:107-11. DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2014.10.007](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.10.007)
30. Lee SH, Yoo HK, Kim SH, Koh WJ, Kim CK, Park YK, et al. The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea. *Ann Lab Med*. 2014;34:31-7. DOI: [10.3343/alm.2014.34.1.31](https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.1.31)