

Artículo original

Estudio de la susceptibilidad a los antibióticos de aislados clínicos de *Mycobacterium abscessus*. Reporte preliminar

Ana Carolina Ramírez Arocha^{a,*}, Omaira Da Mata Jardín^{b,c}, Sandra Fernández Figueiras^c, María Araque^a, Jacobus Henri de Waard^d

^aLaboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. ^bPostgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar. ^cLaboratorio de Diagnósticos Especiales. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela. ^dLaboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Recibido 6 de noviembre de 2012; aceptado 16 de febrero de 2013

Resumen: *Mycobacterium abscessus* posee una elevada resistencia a los antibióticos, lo cual limita las opciones terapéuticas para tratar las infecciones causadas por este microorganismo. En este estudio se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de 26 cepas de *M. abscessus* de origen clínico frente a 14 antibióticos, mediante el método de microdilución en caldo (MDC) de acuerdo al procedimiento descrito por el CLSI (2011). Todas las cepas fueron sensibles a la amikacina, seguidas de claritromicina (62%) e imipenem (46%), mientras que el porcentaje de sensibilidad a ciprofloxacina, ampicilina/sulbactam, meropenem, ceftriaxona, amoxicilina y doxiciclina osciló entre 0 y 8%. Nueve diferentes patrones de resistencia fueron observados, representados por la asociación de 4 a 12 antibióticos. La combinación de 8 y 10 marcadores de resistencia constituyeron los patrones más frecuentes (28% cada uno). La amikacina fue el antibiótico con mayor actividad inhibitoria frente a las cepas estudiadas (0,5 – 16 µg/mL). Los patrones de resistencia observados 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: *Mycobacterium abscessus*, susceptibilidad antimicrobiana, microdilución en caldo, micobacteriosis.

Study of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* clinical isolates. Preliminary report

Abstract: *Mycobacterium abscessus* has a high antibiotic resistance, which limits therapeutic options for treating infections produced by this microorganism. In this study we determined the antimicrobial susceptibility of 26 *M. abscessus* strain of clinical origin towards 14 antibiotics through the broth microdilution method (BMD) according to the procedure described by the CLSI (2011). All the strains were sensitive to amikacine, followed by clarithromycin (62%), and imipenem (46%), while the percentage sensitivity to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam, meropenem, ceftriaxone, amoxicycillin, and doxycycline varied between 0 and 8%. Nine different resistant patterns were observed, represented by the association of 4 to 12 antibiotics. The combination of 8 and 10 resistance markers constituted the most frequent patterns (28% each). Amikacin was the antibiotic with the highest inhibitory activity towards all the strains studied (0.5 – 16 µg/mL). The resistance patterns observed indicate the need of using susceptibility tests as tools that allow to guide and optimize the therapeutic approach to *M. abscessus* produced infections.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*, antimicrobial susceptibility, broth microdilution, mycobacteriosis.

* Correspondencia:
E-mail: ramirezana@ula.ve

Introducción

Mycobacterium abscessus es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente que pertenece al grupo de las micobacterias de crecimiento rápido no pigmentadas (MCR)

[1]. Leao *et al.* propusieron una reclasificación taxonómica de *M. abscessus* y sugirieron que esta especie se subdivida en dos subespecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. y *M. abscessus* subsp. *bolletii* [2].

Durante la última década las infecciones causadas por

M. abscessus se han incrementado considerablemente, aislándose principalmente de infecciones pulmonares crónicas, piel y tejidos blandos. En estas dos últimas se han asociado a heridas quirúrgicas, mesoterapia, implantes de cuerpos extraños, acupuntura, entre otras, afectando no sólo a pacientes inmunocomprometidos sino también a los inmunocompetentes [1,3,4].

M. abscessus es la especie de MCR patógenas más resistente a los antibióticos, lo cual es el resultado de una compleja interacción entre varios mecanismos: la resistencia natural conferida por la estructura de su pared celular altamente hidrofóbica; la de tipo inducible que se produce en presencia de bajas concentraciones del antibiótico, por ejemplo: la presencia de una eritromicina metilasa codificada por el gen *erm* que produce sensibilidad disminuida a macrólidos, y la resistencia por mutaciones adquiridas durante la exposición al fármaco [5-8]. Todos estos mecanismos de resistencia condicionan la sensibilidad de *M. abscessus* a los antibióticos. En consecuencia, es necesario realizar pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. El procedimiento de referencia recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) es el método de microdilución en caldo (MDC) [9-11]. Con base en lo antes descrito, en este estudio se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de 26 cepas de *M. abscessus* de origen clínico mediante el método de MDC.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas: Se estudiaron un total de 26 cepas de *M. abscessus*, procedentes de 6 pacientes masculinos y 20 femeninos, con edades comprendidas entre 1 y 87 años, atendidos en el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela, durante los años 2004 a 2009. Las cepas se obtuvieron de diversas muestras clínicas: 6 de secreciones respiratorias (23,1%) y 20 de infecciones extrapulmonares (76,9%), estas últimas asociadas principalmente a procedimientos cosméticos invasivos tales como mesoterapias, liposucciones e implantes quirúrgicos. Las cepas se mantuvieron preservadas a -70 °C en caldo brain heart infusion (BHI) con glicerol al 20% desde su año de aislamiento y fueron reactivadas inoculándolas en placas de agar sangre e incubándolas entre 4 a 5 días a 34 °C. Posteriormente, utilizando la coloración de Zielh-Neelsen se verificó la morfología bacteriana y propiedades tintoriales [12]. La identificación de las cepas se reconfirmó mediante análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA; del inglés PCR-restriction analysis) siguiendo la metodología descrita por Telenti *et al* [13].

Método de Microdilución en Caldo (MDC): Esta prueba se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por el CLSI en el documento M24-A [10] y cada muestra se procesó por duplicado. La interpretación de los resultados se realizó con base a los puntos de corte para susceptible, intermedio o resistente recomendados por el CLSI (2011) [11], excepto

para los antibióticos ceftriaxona y levofloxacina, en estos casos se utilizaron los puntos de cortes descritos previamente [1,14].

Los antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad fueron: amikacina (AK) (0,5–32 µg/mL; Sigma), claritromicina (CLR) (0,125–8 µg/mL, USP), ceftioxitina (FOX) (0,125–128 µg/mL, Sigma), ceftriaxona (CRO) (0,5–512 µg/mL, Genven, S.A., Venezuela), amoxicilina (AMX) (1–128 µg/mL, Genven, S.A., Venezuela), ampicilina-sulbactam (SAM) (1/0,5-128/64 µg/mL, Laboratorios Richet, S.A., Argentina), imipenem (IMP) (0,06–64 µg/mL, USP), meropenem (MEM) (0,06–64 µg/mL, USP), linezolid (LNZ) (2-128 µg/mL, USP), moxifloxacina (MXF) (0,06–8 µg/mL, USP), ciprofloxacina (CIP) (0,08–8 µg/mL, USP), levofloxacina (LVX) (0,25–16 µg/mL, USP) y doxiciclina (DX) (0,06–64 µg/mL, Sigma). Para estos ensayos se utilizaron como cepas control *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *M. peregrinum* ATCC 700686.

Resultados

Un total de 26 cepas de *M. abscessus* de origen clínico fueron evaluadas por el método MDC frente a 14 antibióticos (Tabla 1). La mayoría de las cepas estudiadas fueron inhibidas por AK, IMP, LNZ, MXF, LVX y CIP en el intervalo de concentración de 2 a 32 µg/mL. En relación a los antibióticos betalactámicos ensayados, con excepción del IMP, el 100% de las cepas mostraron una concentración inhibitoria mínima (CIM) entre 32 y 1.024 µg/mL.

De acuerdo a la interpretación de los resultados (Tabla 2), se observó que todas las cepas fueron sensibles a la AK, seguida de la CLR con 62% e IMP 46%. El fenotipo de sensibilidad intermedia se evidenció con la FOX en el 65% de las cepas estudiadas, mientras que el 100% de resistencia se observó con CRO y DX. Resistencias en el orden de 73% y 96% fueron observadas con AMX, SAM, MEM y las fluoroquinolonas.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos a partir de la distribución de las cepas estudiadas de acuerdo al número de marcadores y patrones de resistencia. La mayoría de las cepas mostraron una variedad de patrones de resistencia múltiple, los cuales se distribuyeron en 8 tipos diferentes, representados por la asociación de 4 a 12 antibióticos. El patrón de resistencia más frecuente fue el tipo 6 (10 marcadores de resistencia), conformado por 7 cepas (28%) distribuidas en 6 distintas combinaciones de antibióticos.

Discusión

En el tratamiento de las infecciones causadas por *M. abscessus* se debe considerar la presentación clínica, el estado inmunológico del paciente y la utilización de terapias combinadas de antibióticos. En la actualidad, son pocos los estudios que comparan diferentes regímenes de tratamiento, así como la relación de la susceptibilidad *in*

Tabla 1. Distribución de las 26 cepas de *M. abscessus* de acuerdo a la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Antibiótico	Número de cepas distribuidas por CIM ($\mu\text{g/mL}$)															
	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	ND
AK				1	2	6	10	4	3							
CLR		6	5	2	2	1	1		1	4	4					
FOX									1	1	16	7	1			
CRO											2		4	12	5	3
AMX										1		6	19			
SAM									1			6	19			
IMP					1	2	10		8	5						
MEM									1		6	7	11	1		
LNZ					1	2	2		5	6	7		3			
MXF					4	3	2		9	8						
LVX							4	7	6	9						
CIP						3	10	8	5							
DX									1	11		14				

Los rectángulos indican el rango de los puntos de corte establecidos por CLSI (2011); para ceftriaxona, tigeciclina, y levofloxacina se utilizaron puntos de corte descritos previamente [1,15]. ND: no se determinó; AK: amikacina; CLR: claritromicina; FOX: cefoxitina; CRO: ceftriaxona; AMX: amoxicilina; SAM: ampicilina/sulbactam; IMP: imipenem; MEM: meropenem; LNZ: linezolid; MXF: moxifloxacina; LVX: levofloxacina; CIP: ciprofloxacina; DX: doxiciclina.

Tabla 2. Interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad en las 26 cepas de *M. abscessus*.

Antibiótico	Interpretación N° cepas (%) (n=26)		
	S	I	R
Amikacina	26(100)		
Claritromicina	16(62)	1(4)	9(35)
Cefoxitina	1(4)	17(65)	8(31)
Ceftriaxona ^a			23(100)
Amoxicilina		1(4)	25(96)
Ampicilina / sulbactam		1(4)	25(96)
Imipenem	12(46)	7(27)	7(27)
Meropenem		1(4)	25(96)
Linezolid	10(38)	6(24)	10(38)
Moxifloxacina	4(15)	3(12)	19(73)
Levofloxacina ^b		3(12)	23(88)
Ciprofloxacina		3(12)	23(88)
Doxiciclina			26(100)

S: susceptible; I: susceptibilidad intermedia; R: resistente. Los puntos de corte para los antibióticos señalados fueron tomados de: ^aGayathri *et al.* 2010 [19]; ^bGarcía-Martos y García Agudo, 2012[1].

in vitro con la eficacia clínica. En este contexto, las pruebas de susceptibilidad son de gran valor al momento de elegir,

suspender o combinar los antibióticos en los tratamientos clínicos [1], lo que requiere que las técnicas utilizadas en estas determinaciones sean confiables.

M. abscessus tiene la particularidad de expresar resistencia múltiple a los antibióticos [5-8]. En este estudio se observó que las 26 cepas de *M. abscessus* se distribuyeron en 8 tipos de patrones de resistencia, predominando los fenotipos compuestos por las asociaciones de 8 y 10 marcadores. La mayoría fueron por lo menos resistentes a 4 de los 6 antibióticos betalactámicos ensayados (CRO, MEM, AMX y SAM), DX y a las fluoroquinolonas (LVX o CIP). Estos resultados son similares a los reportados por Yang *et al.* [15] quienes señalaron que entre 92 al 99% de sus aislados fueron resistentes a MEM, DX, LVX y CIP. De igual forma Ruiz-Aragón y col. [16] registraron una resistencia del 75% para las quinolonas (LVX y CIP) y del 25 % para IMP. En el caso de LNZ los resultados de susceptibilidad de los aislados de *M. abscessus* estudiados son similares a los reportados por otros autores (48-58%) [15-17]. En cuanto a la MXF el porcentaje de resistencia (68%) superó a los encontrados por Park *et al.* (7%) [18]. Es probable que estas diferencias obedezcan a una dinámica geográfica local, determinada por el origen de la cepa, el año de aislamiento, 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 epidemiológica: hospedador, *M. abscessus* y ambiente. No obstante, al igual que en otros estudios [9,15,16,18,19], en este trabajo la AK y la CLR fueron los antibióticos con mejor actividad inhibitoria sobre las cepas estudiadas. Sin

Tabla 3. Distribución de las cepas de *M. abscessus* de acuerdo al número de marcadores y patrones de resistencia.

Tipos	N° de marcadores de resistencia	N° de cepas (%) n = 26	Patrón de resistencia
1	4	1 (4)	CRO, MEM, AMX, DX
2	5	1 (4)	CRO, MEM, AMX, SAM, DX
3	7	1 (4)	CRO, MEM, LXF, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	MEM, MXF, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	CRO, MEM, MXF, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	CLR, MEM, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
4	8	1 (4)	FOX, CRO, MEM, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
		2 (8)	CRO, MEM, MXF, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	MEM, LNZ, MXF, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	CRO, MEM, LNZ, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	CRO, MEM, MFX, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
5	9	1 (4)	FOX, CRO, MEM, MFX, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	CRO, IMP, MEM, MFX, LVX, CIP, AMX, SAM, DX
		1 (4)	CRO, MEM, MFX, LVX, CIP, LNZ, AMX, SAM, DX
		2 (8)	Todos los antibióticos excepto AMK, FOX, LNZ
6	10	1 (4)	Todos los antibióticos excepto AMK, IMP, CIP
		1 (4)	Todos los antibióticos excepto AMK, FOX, IMP
		1 (4)	Todos los antibióticos excepto AMK, IMP, LNZ
		1 (4)	Todos los antibióticos excepto AMK, FOX, IMP
		1 (4)	Todos los antibióticos excepto AMK, IMP, CLR
7	11	1 (4)	Todos los antibióticos excepto AMK, IMP
8	12	1 (4)	Todos los antibióticos excepto AMK

AK: amikacina; CLR: claritromicina; FOX: cefoxitina; CRO: ceftriaxona; AMX: amoxicilina; SAM: ampicilina/sulbactam; IMP: imipenem; MEM: meropenem; LNZ: linezolid; MXF: moxifloxacina; LVX: levofloxacina; CIP: ciprofloxacina; DX: doxiciclina.

embargo, existe el consenso de que no se puede inferir la actividad *in vivo* de los antimicrobianos, la eficacia clínica o las ventajas de una terapia combinada con antibióticos en el tratamiento de infecciones causadas por *M. abscessus*. Probablemente esto es debido a la presencia de diversos mecanismos genéticos que favorecen la resistencia cruzada a antibióticos químicamente diferentes [5,7,8]. En estudios posteriores se analizarán las bases genéticas de los patrones de resistencia observados en las cepas ensayadas.

En Venezuela, existe muy poca información en relación a la epidemiología de las infecciones por MCR, especialmente las ocasionadas por *M. abscessus*, por consiguiente, no se dispone de registros fiables que determinen la incidencia y prevalencia de este microorganismo, así como tampoco de datos sobre el perfil de susceptibilidad frente a los agentes antimicrobianos disponibles en el país. Por tanto, los

hallazgos obtenidos en este estudio constituyen un valioso aporte para las estadísticas epidemiológicas, así como para la orientación del tratamiento empírico, en casos donde se sospeche la participación de *M. abscessus* en infecciones y no se disponga de información inmediata sobre la susceptibilidad de este microorganismo.

En conclusión, los patrones de resistencia múltiple observados en las cepas analizadas, sugieren la necesidad de utilizar las pruebas de susceptibilidad como herramientas que permitirán orientar y optimizar las conductas terapéuticas en infecciones producidas por *M. abscessus*.

Agradecimientos

Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad

de los Andes, Mérida, Venezuela. Proyecto N° FA-513-12-03-B.

Referencias

- García-Martos P, García-Agudo L. Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30:192-200.
- Leao SC, Tortoli E, Euzéby JP, García 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 amended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011; 61:2311-3.
- 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.
- Alcaide F, Esteban J. Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28 Suppl 1:S46-50.
- 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*. *Plos One.* 2009; 4:1-11.
- Medjahed H, Gaillard J-L, Reytrat J-M. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol.* 2009; 18:117-23.
- Nessar R, Cambau E, Reytrat J, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:810-8.
- van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, Mouton JW. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat.* 2012; 15:149-61.
- Lee S, Kim J, Jeong J, Park Y, Bai G-H, Lee E, Lee M, Chang C. 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. Document M24-A. USA: CLSI; 2003.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. Document M24-A2; Second Edition. USA: CLSI; 2011.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas a color.* 5^{ta} ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid Identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:175-8.
- 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.
- Yang SC, Hsueh PR, Lai HC, Teng LJ, Huang LM, Chen JM y col. High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:1958-62.
- Ruiz-Aragón J, García-Agudo L, Flores S, Rodríguez MJ, Marín P, García-Martos P. Sensibilidad a los antimicrobianos de micobacterias de crecimiento rápido. *Rev Esp Quimioterap.* 2007; 20:429-32.
- Wallace RJ JR, Brown-Elliott BA, Ward SC, Crist CJ, Mann LB, Wilson RW. Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:764-7.
- Park S, Kim S, Park E, Kim H, Kwon J, Chang C, Lew W, Park Y, Koh W-J. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea. *J Korean Med Sci.* 2008; 23:49-52.
- Gayathri R, Therese K, Deepa P, Mangai S, Madhavan HN. Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. *J Postgrad Med.* 2010; 56:76-8.