



Avances en Biomedicina  
ISSN: 2477-9369  
ISSN: 2244-7881  
avanbiomed.idic@gmail.com  
Universidad de los Andes  
Venezuela

## Aspectos clínicos y microbiológicos de las infecciones producidas por el complejo *Mycobacterium abscessus*

**Ramírez, Ana; Araque, María**

Aspectos clínicos y microbiológicos de las infecciones producidas por el complejo *Mycobacterium abscessus*

Avances en Biomedicina, vol. 6, núm. 2, 2017

Universidad de los Andes, Venezuela

**Disponible en:** <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331355420005>

## Aspectos clínicos y microbiológicos de las infecciones producidas por el complejo *Mycobacterium abscessus*

(Clinical and microbiological aspects of infections by the *Mycobacterium abscessus* complex)

Ana Ramírez ramirezana@ula.ve

Universidad de Los Andes, Venezuela

María Araque

Universidad de Los Andes, Venezuela

Avances en Biomedicina, vol. 6, núm. 2, 2017

Universidad de los Andes, Venezuela

Recepción: 09 Enero 2017  
Aprobación: 07 Marzo 2017

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331355420005>

**Resumen:** El complejo *Mycobacterium abscessus* está conformado por micobacterias de crecimiento rápido (MCR) e incluye especies patógenas emergentes multirresistentes que causan infecciones localizadas, diseminadas e, incluso, brotes nosocomiales por contaminación de equipos médicos. Durante las últimas décadas se ha observado un incremento considerable de estas infecciones. El diagnóstico microbiológico además de incluir el análisis de laboratorio clásico, comprende también la caracterización molecular y pruebas de susceptibilidad, estas últimas son de vital importancia debido a que las distintas especies que conforman el complejo *M. abscessus* presentan perfiles de susceptibilidad variables a los antimicrobianos de uso habitual en la práctica clínica. En este artículo comentamos aspectos relevantes del diagnóstico clínico y microbiológico de las infecciones pulmonares y de piel y tejidos blandos producidas por subespecies del complejo *M. abscessus*.

**Palabras clave:** *Mycobacterium abscessus*, diagnóstico microbiológico, enfermedad pulmonar, infecciones de piel y tejido blando.

**Abstract:** *Mycobacterium abscessus* complex includes rapidly growing mycobacteria (RGM) and emerging multidrug resistant pathogens that cause localized, disseminated infections and even nosocomial outbreaks from contamination of medical equipment. In the last decades, the incidence of these infections has significantly increased. The microbiological diagnosis, in addition to the classic laboratory analysis, also includes the molecular characterization and susceptibility tests, the latter being of vital importance because the different species of *M. abscessus* complex have variable susceptibility profiles to the antimicrobials of used in clinical practice. In this paper we discuss relevant aspects of the clinical and microbiological diagnosis of lung and skin and soft tissue infections produced by subspecies of *M. abscessus* complex.

**Keywords:** *Mycobacterium abscessus*, microbiological diagnosis, pulmonary disease, skin and soft tissue infections.

### Introducción

El análisis del genoma del complejo *Mycobacterium abscessus* ha originado múltiples revisiones en la taxonomía de estos microorganismos. Actualmente no se ha logrado un consenso en la denominación de estas micobacterias, algunos investigadores señalan que el complejo *M. abscessus* está conformado por 3 genomoespecies: *M. abscessus*, *M. bolletii* y *M. massiliense* (1). Sin embargo, recientemente se reportó que

las distancias genómicas encontradas entre las especies de este grupo bacteriano no son suficientes para justificar la distinción en especie, pero sí cumplen con los criterios para diferenciarlas en subespecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* y *M. abscessus* subsp. *bolletii* (2,3,4). En esta revisión bibliográfica utilizaremos la clasificación en genomoespecies.

Las especies del complejo *M. abscessus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo el ambiente el reservorio más importante y la fuente principal de infección para el hombre. Estas bacterias son bacilos ácido-resistentes (BAR), aerobios obligados, inmóviles, no esporulados, no producen pigmentos y crecen en un rango de temperatura que oscila entre 28 y 35°C (5,6). Desde el punto de vista clínico y epidemiológico, las patologías más importantes producidas por las especies que conforman este complejo son: la enfermedad pulmonar y las infecciones de piel y tejido blando. En las últimas décadas la incidencia de estas infecciones se ha incrementado significativamente en todo el mundo (3,7). En Venezuela se ha registrado un notable ascenso de las infecciones de piel y tejido blando asociadas con procesos cosméticos producidas por el complejo *M. abscessus* (8,9,10).

Otro aspecto que enfatiza la importancia clínica del complejo *M. abscessus* es la elevada resistencia a los quimioterápicos antituberculosos y a la mayoría de los agentes antimicrobianos, siendo este grupo bacteriano el más resistente a los antibióticos, considerándoseles un problema de salud pública (7,11). Adicionalmente, estas micobacterias fenotípicamente presentan perfiles de susceptibilidad variable a los antibióticos de uso habitual en la práctica clínica (7,12,13). Por consiguiente, existe la necesidad de identificar correctamente cada aislado y realizar los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. En este contexto, a continuación se describirán los aspectos más relevantes y actualizados sobre la clínica y el diagnóstico microbiológico de la enfermedad pulmonar y de las infecciones de piel y tejidos blandos producidas por las especies del complejo *M. abscessus*.

## Diagnóstico clínico

**Enfermedad pulmonary.** Se presenta particularmente en pacientes con cáncer de pulmón o con enfermedades subyacentes, tales como: la fibrosis quística, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o individuos que previamente hayan tenido tuberculosis, entre otras (5). Se desconoce aún si existe un periodo de latencia tras la infección y generalmente la enfermedad es asintomática, pero de curso progresivo, y se manifiesta exacerbando los síntomas de la patología subyacente produciendo una disminución de la función pulmonar y deterioro de la calidad de vida. También puede complicarse y evolucionar a una insuficiencia respiratoria aguda (3). El establecimiento del diagnóstico clínico y microbiológico de la enfermedad pulmonar debida al complejo *M. abscessus* no es sencillo, puesto que el aislamiento de estos microorganismos a partir de muestras clínicas

no es, en sí mismo, diagnóstico de la enfermedad (14). La Sociedad Americana de Tórax (ATS, del inglés American Thoracic Society) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, del inglés Infectious Diseases Society of America) han emitido un conjunto de criterios para diferenciar el aislamiento ocasional de micobacterias no tuberculosas (MNT), que incluyen las MCR, de la verdadera enfermedad pulmonar producida por este grupo de microorganismos, estas directrices comprenden la evidencia clínica, radiológica y microbiológica de la enfermedad (Tabla 1). De tal manera que es necesario evaluar en conjunto la condición fisiopatológica del paciente, los antecedentes epidemiológicos, el cultivo de un espécimen clínico representativo y/o el análisis histológico de una biopsia de tejido. Además, es importante la comunicación entre el médico y el microbiólogo para contribuir a optimizar el diagnóstico de laboratorio (3,14). En la tabla 2 se resumen el diagnóstico diferencial de la enfermedad pulmonar producidos por *M. abscessus*.

**Tabla 1.**

Resumen de los criterios diagnósticos para las infecciones pulmonares producidas por micobacterias no tuberculosas propuestos por la Sociedad Americana de Tórax.

| Tipo de diagnóstico | Criterio diagnóstico                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clínico             | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Síntomas pulmonares, presencia de opacidades nodulares o cavitarias en la radiografía de tórax o la observación de bronquiectasias multifocales con nódulos pequeños múltiples reveladas por una tomografía computarizada de alta resolución.</li> <li>✓ Apropiaada exclusión de otros diagnósticos.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Microbiológico      | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cultivos positivos en dos muestras de esputo expectorados por separado (si los resultados de las muestras de esputo inicial no son diagnósticos, considerar repetir la baciloscopia y cultivo).</li> <li>✓ Cultivos positivos en un lavado bronquial.</li> <li>✓ Biopsia pulmonar transbronquial o de otro tipo con características histopatológicas de micobacterias (inflamación granulomatosa o BAR) y un cultivo positivo para MNT a partir de uno o más esputos o lavados bronquiales.</li> <li>✓ Consultar a expertos cuando se recuperen MNT infrecuentes o que representen una contaminación ambiental.</li> <li>✓ Pacientes con sospecha de enfermedad pulmonar por MNT, pero que no cumplen con los criterios de diagnósticos deben ser sometidos a un seguimiento hasta que el diagnóstico esté firmemente establecido o excluido.</li> <li>✓ El diagnóstico de la enfermedad pulmonar MNT, <i>per se</i>, no hace necesaria la instauración de la terapéutica antimicrobiana, es una decisión que debe basarse en los posibles riesgos y beneficios de la terapia individual para los pacientes.</li> </ul> |

MNT: micobacterias no tuberculosas; BAR: bacilos ácido-resistentes. Tomado de van Ingen, 2013 (14).

*Infecciones de piel y tejidos blandos.* Generalmente se originan posterior a un procedimiento quirúrgico, trauma u otras técnicas, tales como acupuntura, liposucción, mesoterapias, implantes mamarios, inyección de silicona, uso de catéteres intravenosos, entre otros (5,15). La sospecha diagnóstica se realiza de acuerdo con datos referenciales (inyecciones, heridas traumáticas o quirúrgicas, profesión u ocupación, exposición a agua o uso de sustancias contaminadas con MNT, etc.), las manifestaciones clínicas, la negatividad de los estudios microbiológicos tradicionales, además del inicio tardío de los síntomas (2 a 14 semanas) después del antecedente (8,15).

La presentación clínica es variable de acuerdo a la especie de MCR involucrada, las lesiones aparecen como pápulas eritematosas violáceas y pústulas que luego progresan a nódulos ulcerados. También se pueden observar abscesos subcutáneos piógenos con una reacción inflamatoria aguda, dermatitis, celulitis, foliculitis, úlceras y reacción inflamatoria crónica con formación de fistulas. Si bien las lesiones son más comunes en las extremidades inferiores, seguido de las extremidades superiores y tronco, algunas tienen una distribución particular como las relacionadas con procedimientos cosméticos (8,15,16,17,18). En la tabla 2 se resume el diagnóstico diferencial de las infecciones de piel y tejidos blandos producidos por *M. abscessus*.

## Diagnóstico microbiológico

Incluye la observación microscópica directa de muestras clínicas, el cultivo, la identificación de las especies aisladas mediante técnicas fenotípicas, bioquímicas, cromatográficas o moleculares y las pruebas de susceptibilidad (7).

*Recolección de muestras: Origen pulmonar.* Un diagnóstico apropiado comienza con la recolección de una muestra de buena calidad. Un estudio aleatorio demostró que la correcta instrucción de los pacientes para la recolección adecuada de las muestras de esputo aumenta el rendimiento de la detección (27- 32%) en el examen directo de BAR para el diagnóstico de tuberculosis (TB). Es probable que este incremento pueda ser observado también en los pacientes con infecciones respiratorias por MNT (20).

**Tabla 2.**  
Diagnóstico diferencial de la enfermedad pulmonar e infecciones de piel y tejidos blandos producidos por *M. abscessus*.

| Infección              | Diagnóstico diferencial                                                                                                                                             | Comentario                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Referencia                      |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Pulmonar               | Tuberculosis                                                                                                                                                        | El estudio radiológico muestra bronquiectasia y lesiones nodulares (lóbulos superiores) que se asemejan a la tuberculosis pulmonar. Autores han sugerido que la enfermedad pulmonar por MNT se caracteriza por cavidades de paredes delgadas, mientras que la tuberculosis se presenta con cavidades de paredes gruesas. | Lee et al.(3)<br>van Ingen (14) |
|                        | Malignidad, sarcoidosis, hongos, Nocardiosis                                                                                                                        | En todas se presentan las lesiones cavitarias                                                                                                                                                                                                                                                                            | van Ingen (14)                  |
| Piel y tejidos blandos | Tuberculosis, leishmaniasis, úlceras piógenas, los nódulos reumatoideos, los granulomas a cuerpo extraño, esporotricosis, nocardiosis y botriomicosis, entre otras. | El diagnóstico diferencial debe hacerse con todas aquellas entidades que se manifiestan por nódulos, abscesos, úlceras o trayectos fistulosos.                                                                                                                                                                           | Ortegón et al. (19)             |

Un aspecto importante a considerar en el procesamiento microbiológico es la temperatura de almacenamiento de las muestras de origen respiratorio. Estudios comparativos señalan que el

almacenamiento de muestras de esputo a temperatura ambiente afecta la viabilidad de *M. tuberculosis* (disminuye del 92% al 83%), por el contrario, a 4°C se observó una mejor preservación de este microorganismo y las baciloscopias positivas no mostraron variaciones (20). Por lo tanto, se recomienda mantener las muestras a dicha temperatura hasta el momento de su procesamiento. Hasta ahora no se ha determinado el efecto del retraso en el procesamiento de las muestras de esputo sobre los resultados de microscopía y cultivo para el aislamiento de MNT.

**Muestras de piel y de tejidos blandos.** Las muestras que ofrecen mayor probabilidad de aislamiento de las especies del complejo *M. abscessus* son el material de drenaje obtenido de abscesos cerrados y la biopsia tisular. Los aislamientos procedentes de la piel y de partes blandas suelen ser clínicamente importantes, a diferencia de lo que sucede con los aislados obtenidos a partir de muestras de origen respiratorio (15,21).

Una muestra de buena calidad debe recolectarse antes de iniciar un tratamiento empírico con antibiótico y se tomará únicamente de aquellas lesiones que presenten signos clínicos de infección, igualmente la cantidad de este material clínico debe ser adecuada evitando, en lo posible, la contaminación con la flora bacteriana comensal. En biopsias y heridas cerradas se recomienda desinfectar la piel con clorhexidina al 2%, etanol 70% o povidona yodada 10%. En este último caso, se debe dejar secar la solución y eliminar el exceso de yodo con etanol antes de iniciar la recolección de la muestra. En heridas abiertas, se aconseja eliminar el material necrótico y los tejidos desvitalizados y lavar “a chorro” con solución salina fisiológica estéril. No se recomienda tomar muestras superficiales mediante la utilización de una torunda o hisopado, debido a que los aislamientos en la superficie de la herida pueden no reflejar exactamente los microorganismos que se encuentran en la profundidad de la misma (21).

En el caso de abscesos cerrados, se recomienda aspirar el material purulento con una jeringa, preferiblemente a través de una zona de piel sana. Si así no se obtiene muestra, se puede inyectar solución salina fisiológica estéril en el tejido subcutáneo e intentar volver a aspirar. Una vez realizada la aspiración, se debe expulsar el aire, tapando la aguja con una gasa estéril impregnada en alcohol para eliminar el riesgo de aerosoles. Posteriormente, se cambia la aguja por otra estéril y se inocula parte del contenido en medios de cultivos selectivos y no selectivos – los cuales se describirán más adelante– y la otra porción de la muestra se utilizará para realizar extendidos en láminas portaobjetos para ser teñidos y observados en el microscopio. En el caso de muestras de tejidos obtenidos mediante biopsias, se recomienda obtener suficiente muestra, evitando las zonas necróticas. Estas muestras pueden obtenerse mediante punción- aspiración (biopsia con sacabocados, también llamada *punch*), o mediante procedimiento quirúrgico abierto (21).

**Observación microscópica.** Proporciona el primer indicio de la presencia BAR, característica que ayuda en la detección inicial y conjuntamente con los datos clínicos puede orientar el diagnóstico presuntivo de micobacteriosis sin establecer diferencias entre las distintas especies de

este grupo bacteriano (7,22). En muestras obtenidas de lesiones cutáneas o subcutáneas, a diferencia del esputo, la utilidad de las tinciones es limitada debido al recuento bajo de BAR (7,15). Frecuentemente se utilizan 2 técnicas de tinción: coloración con fluorocromo y la coloración de Zielh-Neelsen (ZN), en ambas técnicas los colorantes auramina y carbolfucsina se unen al ácido micólico de la pared celular de las micobacterias, por consiguiente, los BAR se observan de color amarillo brillante o fucsia, respectivamente (22).

La coloración con fluorocromo presenta una baja sensibilidad (22%) y una elevada especificidad (99,2%) con respecto a la técnica convencional de ZN debido a que los tejidos no específicos o detritos celulares pueden ser confundidos con bacilos al utilizar un objetivo de bajo aumento (25X), por lo que se recomienda recurrir a una magnificación mayor (40X) para confirmar cualquier forma bacteriana sospechosa. Por otra parte, una de las principales ventajas de la auramina es la reducción hasta cuatro veces del tiempo para la valoración del examen microscópico (22,23).

*Estudios histopatológicos.* Microscópicamente en biopsias tejido cutáneo se observa un patrón nodular o granulomatoso difuso y en la mayoría de los casos (91,3%) se aprecia una reacción granulomatosa supurativa sin caseificación. En pacientes con infección por *M. abscessus* se han reportado lesiones mixtas con abscesos rodeados por las células gigantes de Langhans y células epitelioides en el 80% de las biopsias analizadas. Sin embargo, en el 82% de los casos donde se observaron espacios vacuolares dentro de los abscesos rodeados de células inflamatorias la presencia de BAR solo alcanzó el 27% (16).

**Descontaminación.** Las muestras clínicas que naturalmente no son estériles (esputo, lavado broncoalveolar, heces, etc.), deben ser sometidas a la acción de un reactivo descontaminante, con la finalidad de disminuir la flora habitual de esas regiones anatómicas y facilitar el aislamiento de las micobacterias. En la Tabla 3 se resumen algunos métodos de digestión y descontaminación empleados en la práctica clínica. Las muestras como líquido cefalorraquídeo, sinovial y otros líquidos corporales que normalmente son estériles no necesitan ser descontaminados antes de ser cultivados (14,22,24).

*Medios de cultivo.* El cultivo primario de las micobacterias debe incluir un medio de cultivo no selectivo y otro selectivo, este último suplementado con antimicrobianos para evitar el crecimiento excesivo de bacterias y hongos contaminantes (22). Las especies del complejo *M. abscessus* puede crecer en medios de cultivos enriquecidos (ej. agar sangre) o medios básicos, tales como: agar tripticasa soya, agar infusión cerebro-corazón (BHI), agar Müller Hinton, entre otros (24). Además, existen tres formulaciones generales específicas para micobacterias que pueden emplearse:

*Medios de agar semisintéticos (Middlebrook 7H10 y 7H11).* Contienen sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa y verde de malaquita para inhibir otras bacterias. Estos medios de cultivo se emplean para observar la morfología de las colonias,

realizar las pruebas de susceptibilidad y, cuando se añaden antibióticos, son utilizados como medios selectivos (22).

**Medios a base de huevo (Löwenstein-Jensen, Petragnani, Ogawa Kudod, medio ATS, entre otros).** Contienen sales definidas, glicerol, verde de malaquita y sustancias orgánicas complejas, tales como huevo fresco, harina de papa y otros ingredientes en combinaciones diversas (22).

**Medios en caldo (Middlebrook 7H9 y 7H12).** Favorecen la proliferación de inóculos pequeños y son recomendados para todas las muestras. Estos medios de cultivo se suplementan con sustratos de enriquecimiento, tales como: albúmina, dextrosa, estearato de polioxietileno, catalasa, ácido oleico (OADC, del inglés oleic acid, albumin, dextrose, catalase) e inhibidores para bacterias y hongos (PANTA: polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim, y azlocilina). Generalmente, los cultivos se procesan en sistemas de incubación y lectura automatizados como: BACTEC 460TB, BACTEC MGIT 960, MB/Bact Alert 3D, ESP Culture System II, entre otros, cuyas características se describen en la Tabla 4 (7,22).

**Tabla 3.**  
Métodos de digestión y descontaminación de muestras.

| Método               | Agentes descontaminantes                                                | Comentarios                                                                                                                                                              |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kubica               | N-acetil-L-cisteína (NALC) e hidróxido de sodio (NaOH) al 2%.           | La NALC debe prepararse diariamente. La concentración de NaOH puede aumentarse al 3%, con un límite de exposición máximo de 15 min. Es el método más utilizado.          |
| Tacquet y Tison      | Laurilsulfato de sodio al 3% y NaOH al 1%                               | Se debe cultivar en medios con huevo para neutralizar los restos del detergente. Es incompatible con el BACTEC y los sistemas automatizados de cultivo no radiométricos. |
| Petroff              | NaOH al 4%                                                              | Descontaminación agresiva con efecto homogeneizante. Requiere control riguroso del tiempo de exposición ( $\leq 15$ min).                                                |
| Karlson              | Fosfato trisódico al 13% y cloruro de benzalconio (Zefiran)             | Se debe sembrar en medios con huevo o neutralizar con lecitina y no debe emplearse con los sistemas automatizados.                                                       |
| Löwenstein-Sumiyoshi | Ácido sulfúrico al 4-5%                                                 | Práctico en laboratorios con gran número de muestras de orina.                                                                                                           |
| Smithwick            | Cloruro de cetilpiridinio al 1% y NaCl al 2%                            | Requiere un mínimo de 24 h de exposición. Debe sembrarse en medios con huevo o previa neutralización del amonio cuaternario.                                             |
| Whittier             | NALC-NaOH (0,25%-1%) seguido con un tratamiento con ácido oxálico al 5% | Se recomienda para muestras de esputo provenientes de pacientes con FQ. Reduce la tasa de contaminación en un 74% en el medio Löwenstein-Jensen.                         |

Tomado de van Ingen, 2013 (14); Alcaide et al., 2005 (25); Whittier et al., 1997 (26). FQ: fibrosis quística.

## Identificación

*Métodos convencionales.* La diferenciación entre especies micobacterianas se basa en la observación de las tasas de crecimiento, morfología de las colonias, capacidad de producción de pigmentos, forma y propiedades tintoriales (ZN) y rasgos fenotípicos (pruebas bioquímicas). Sin embargo, estos métodos requieren con frecuencia de 6 a 8 semanas para determinar

la identificación (7). Algunas pruebas bioquímicas incluyen: crecimiento en el medio de cultivo primario menor a 7 días, ausencia o presencia de pigmentación, crecimiento entre 30°C y 35°C, producción de arilsulfatasa a los 3 días, nitrato reductasa, ureasa, hidrólisis del tween 80, prueba de absorción de hierro, tolerancia al cloruro de sodio (5%), crecimiento en agar Mac Conkey sin cristal violeta y utilización de manitol, inositol, sorbitol y citrato (7,22).

La identificación por métodos fenotípicos puede generar resultados ambiguos o erróneos debido a que las técnicas son pocos reproducibles y requieren períodos prolongados de incubación. Por otra parte, la expresión fenotípica puede ser variable inter e intra- especie y no permite distinguir entre especies pertenecientes al mismo complejo, por tal razón en la actualidad estos métodos son poco utilizados (30). La susceptibilidad antimicrobiana y el análisis de ácidos micólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) también se han utilizado para diferenciar a algunas especies de MCR. Estos métodos tienen una capacidad discriminatoria limitada, convirtiéndose en técnicas anacrónicas (31,32). La importancia de un diagnóstico precoz ha motivado el desarrollo de técnicas nuevas sensibles y específicas que sustituyen con ventaja la microscopía, poco específica y sensible, y superan la lentitud e inconvenientes del cultivo microbiológico. A continuación se exponen algunas de estas técnicas:

Tabla 4.

Sistemas de detección automatizados y semiautomatizados para el cultivo de micobacterias.

| Sistema de cultivo                                                       | Medio de cultivo                                                   | Sistema de detección                                                                                                         | Comentario                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BACTEC460TB<br>BacTMB (bioMérieux,<br>Durham, NC)                        | M7H12                                                              | Sustrato ácido palmítico<br>marcado con C <sub>14</sub> . Lectura<br>semiautomatizada                                        | Permiten un diagnóstico<br>microbiológico temprano<br>incluyendo pruebas de<br>susceptibilidad. Desventaja: la<br>eliminación del material radioactivo.                                                                                                                                                 |
| ESP Culture System II<br>(VersaTREK; Trek<br>Diagnostics, Cleveland, OH) | M7H9 modificado<br>suplementado con OADC                           | Sensores de presión que<br>detectan el consumo de<br>oxígeno.                                                                | Es un sistema no radiométrico de<br>monitorización continua para la<br>detección y determinación de la<br>susceptibilidad. Permite el<br>procesamiento de todo tipo de<br>muestras.                                                                                                                     |
| MB/Bact                                                                  | M7H9 modificado, con<br>sensor colorimétrico                       | Presencia de CO <sub>2</sub> como<br>indicador de crecimiento<br>bacteriano                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| MGIT TB960 (Mycobacterial<br>growth indicator tube, BD<br>Biosciences)   | MGIT (M7H9 modificado<br>con OADC y antibióticos)                  | Sensores de fluores-<br>cencia, se activan con luz<br>ultravioleta (UV) y/o por la<br>presencia de turbidez no<br>homogénea. | El medio MGIT permite la lectura<br>manual con una fuente de luz UV.<br>Desventaja: requiere mayor<br>manipulación ya que los antibióticos<br>y suplemento se añaden con pipeta.<br>Se utiliza para las pruebas de<br>susceptibilidad de <i>M. tuberculosis</i> a<br>los antibióticos de primera línea. |
| Sistema MB/BacT ALERT 3D                                                 | M7H9 suplementado con<br>factores de crecimiento y<br>antibióticos | Cultivo colorimétrico que<br>detecta la producción de<br>CO <sub>2</sub> como indicador de<br>crecimiento bacteriano.        | Los cultivos permanecen en el<br>incubador-lector sin un manejo<br>adicional hasta que el equipo<br>notifica su positividad o bien su<br>negatividad. Se puede procesar<br>todo tipo de muestras.                                                                                                       |
| BACTEC460TB<br>BacTMB (bioMérieux,<br>Durham, NC)                        | M7H12                                                              | Sustrato ácido palmítico<br>marcado con C <sub>14</sub> . Lectura<br>semiautomatizada                                        | Permiten un diagnóstico micro-<br>biológico temprano incluyendo<br>pruebas de susceptibilidad.<br>Desventaja: la eliminación del<br>material radioactivo.                                                                                                                                               |

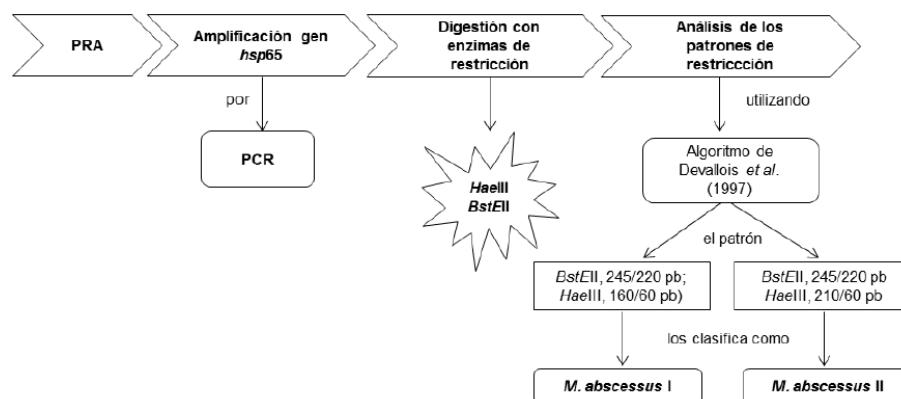
Tomado de Alcaide et al., 2005 (25); Cansal, 2003 (27); De Juan Ferré, 2005 (28); Cortes, 2009 (29).

## Métodos no convencionales

*Técnicas moleculares.* Debido a las limitaciones que presentan los métodos convencionales, se ha recurrido a los sistemas de taxonomía molecular que se aplican a la clasificación y al estudio filogenético de estos microorganismos. Estas técnicas son más rápidas, sensibles, precisas y no son modificables por condiciones ambientales (30). Entre los métodos moleculares destacan los basados en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR del inglés polymerase chain reaction), los cuales presentan una alta sensibilidad y especificidad cuando se acompañan de otras técnicas como: el estudio de polimorfismo genético generado por la digestión con enzimas de restricción, la hibridación con sondas específicas o la amplificación y secuenciación de cadenas nucleotídicas (24,30,31).

A nálisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA del inglés PCR Restriction fragment length polymorphism analysis). Se fundamenta en la amplificación por PCR de un fragmento de 439

pb del gen *hsp65* que codifica para una proteína de shock térmico. El producto es sometido a la acción de dos enzimas de restricción *BstEII* (a 60°C por 60 min.) y *HaeIII* (a 37°C por 60 min.) (fig. 1). El patrón de bandas obtenido se compara con algoritmos disponibles en una base de datos (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>), lográndose identificar la mayoría de las especies aisladas en 4 - 5 horas a partir de pocas colonias crecidas en medios de cultivo sólidos o líquidos. Un posible inconveniente puede ser la variabilidad genética de algunas cepas, que puede resultar en patrones de bandas desconocidos o no descritos anteriormente (33,34).



**Figura 1.**

Esquema general del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PRA).

El perfil de restricción divide al complejo *M. abscessus* en 2 grupos: *M. abscessus* tipo I (*BstEII*, 245/220 pb; *HaeIII*, 160/60 pb) y *M. abscessus* tipo II (*BstEII*, 245/220 pb y *HaeIII*, 210/60 pb). Para la diferenciación de las especies se requiere de la secuenciación del ARNr16S u otra técnica molecular adicional para la identificación definitiva (34).

Una variante de la técnica de PRA fue descrita por Shin et al. (35), quienes evaluaron la utilidad de este método empleando el gen *tuf* que codifica para un factor de elongación Tu (EF-Tu), el cual es esencial para la actividad biológica de ARNmt (ARN-mensajero- transferencia o ARN10S). El PRA-*tuf* produjo 43 patrones de restricción con la enzima de restricción *HaeIII*, de los cuales 35 (81,4%) fueron patrones únicos para las especies de MNT estrechamente relacionadas. En el caso del complejo *M. abscessus* el fragmento (744 pb) digerido con *HaeIII* origina un patrón de 557/84/58 pb y la digestión con *MboI* permite la separación entre *M. abscessus* (295/262/101 pb) y *M. bolletii* (399/262 pb). De tal manera que el algoritmo de restricción utilizando el gen *tuf* es una herramienta que presenta mayor ventaja que el PRA clásico para la identificación de especies de MNT.

*Análisis del número variable de repeticiones en tándem (VNTR del inglés variable-number tandem repeat).* Esta técnica se basa en que muchos genes bacterianos o regiones intergénicas contienen locus de ADN repetitivos, cuyo número de unidades repetidas o copias puede variar entre las cepas. Estas regiones VNTR se han identificado esencialmente en todas las especies de procariotas y eucariotas y se han utilizado con éxito para la tipificación e identificación molecular, incluyendo cepas de

micobacterias (36,37). En la figura 2 se muestra un esquema general de esta metodología.

Choi et al. (37) desarrollaron un método de PCR doble basado en VNTR para discriminar entre las especies del complejo *M. abscessus*. Los cebadores diseñados por estos investigadores evitan el solapamiento entre la amplificación de los dos locus designados VNTR11 (repetición en tándem de 33 pb) y VNTR23 (22 pb). En la caracterización con VNTR11, *M. abscessus* mostró 4 copias de diferentes longitudes (212 a 278 pb), mientras que solo una unidad repetida de 179 pb fue observada en *M. massiliense* y *M. bolletii*. Con VNTR23, *M. abscessus* y *M. bolletii* mostraron 2 copias (196 o 217 y 196 pb, respectivamente), por el contrario, las cepas de *M. massiliense* fueron negativas para VNTR23.

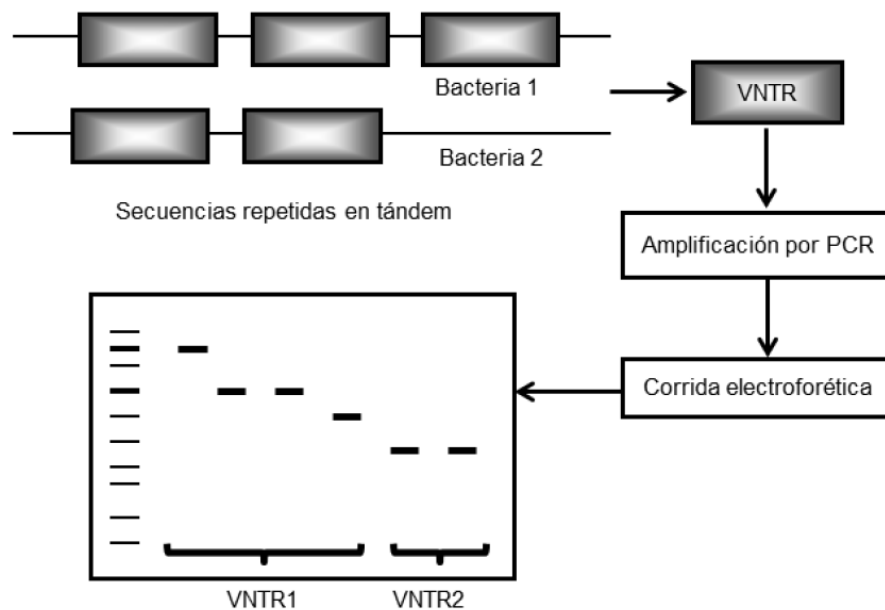


Figura 2.

Esquema general del análisis del número variable de repeticiones en Tándem (VNTR)

**Hibridación con sondas moleculares.** Se utilizan sondas comerciales de ADN (AccuProbe®, GenProbe Inc., San Diego, Estados Unidos) no radiactivas que hibridizan con el ARNr micobacteriano de forma rápida (2h) y específica. Aunque no hay disponibilidad del uso de sondas moleculares para la identificación del complejo *M. abscessus*, su aplicación está limitada a los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* (MAC) así como para las especies *M. intracellulare*, *M. goodii* y *M. kansasii* (38).

**Amplificación y detección en tiempo real del gen *hsp65*.** Estos métodos se basan en la realización simultánea de la amplificación de una zona diana específica y el reconocimiento de ésta mediante hibridación que, a su vez, es detectada y cuantificada mediante el uso de diversos fluorocromos. Las mayores ventajas residen en su rapidez (3h) y en las posibilidades futuras de aplicación para un amplio abanico de especies, así como en la detección e identificación directa a partir de muestras clínicas. En la actualidad, existen diversos sistemas de amplificación y marcaje, BDProbeTec® ET (Becton Dickinson, Sparks, Estados Unidos), LightCycler® (Roche

Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y ABI Prism 7700® con sondas TaqMan® (PE Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) (25).

Recientemente, un ensayo de PCR con sonda de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) en tiempo real fue desarrollado para el diagnóstico de micobacterias. Los PNA tienen propiedades de hibridación, química, térmica y de estabilidad biológica más favorables debido a su naturaleza y se han aplicado ampliamente como herramienta de diagnóstico en la biología molecular. Específicamente, para la identificación de micobacterias se emplea un PNA multi-sonda dirigida al gen *hsp65* en una PCR en tiempo real (*hsp65* PNA RT-PCR). El método tiene una sensibilidad del 99,6% y permite la diferenciación de las especies o niveles de genotipo del complejo *M. abscessus* (39).

**Tabla 5.**  
Características de la secuencia del gen *erm*(41) y de la región aguas arriba de *M. abscessus*, *M. bolletii* y *M. massiliense*

| Característica del gen <i>erm</i> (41)                   | <i>M. abscessus</i> | <i>M. bolletii</i> | <i>M. massiliense</i>                                |
|----------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|------------------------------------------------------|
| Tamaño del amplificado (pb)                              | 892                 | 892                | 616                                                  |
| Secuencia del promotor                                   | TATCGA              | TGTCGA             | TGTCGA                                               |
| Nucleótido 28                                            | T o C               | T                  | T                                                    |
| Delección                                                | No                  | No                 | Nucleótido 64-65 y 274 pb después del nucleótido 158 |
| Posición de las sustituciones nucleotídicas <sup>b</sup> |                     |                    |                                                      |
| 171                                                      | A                   | A o G              | - <sup>c</sup>                                       |
| 231                                                      | T                   | T o C              | -                                                    |
| 249                                                      | G                   | G o A              | -                                                    |
| 253                                                      | C                   | C o A              | -                                                    |
| 255                                                      | G                   | G o T              | -                                                    |
| 258                                                      | T                   | T o C              | -                                                    |
| 312                                                      | A                   | C                  | -                                                    |
| 336                                                      | T                   | C                  | -                                                    |
| 414                                                      | A                   | A o G              | -                                                    |

a: Secuencia referencia MAB30 (GenBank EU590129.1); b: Sistema de numeración del gen *erm*(41), con codón de inicio GTG como 1; c: sin nucleótido en esta posición debido a la eliminación de 276 pb. Tomado de Bastian et al. (41).

*Amplificación y secuenciación de regiones específicas de ADN*. Se basa en la amplificación, mediante PCR u otro sistema, de una zona de ADN blanco (diana) y análisis post-amplificación mediante secuenciación. En las micobacterias existen regiones bien conservadas del ADN propias del género que flanquean regiones hipervariables específicas para cada especie. En la actualidad, la identificación de las especies del complejo *M. abscessus* depende exclusivamente de un análisis múltiple de secuencia de varios genes blancos que incluyen *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa), *hsp65*, *gnd* (6-fosfogluconato dehidrogenasa), *glpK* (glicerol quinasa), *secA* (proteína esencial), *dnaJ* (proteína que induce choque térmico), *recA* (proteína de recombinación), *gyrA*, *gyrB* (ADN girasa), *sodA* (superóxido dismutasa) y un fragmento de 350 pb del gen que codifica para el ARNr16S (37,40). En el 2011, Bastian et al. (41) identificaron una serie de características de secuencia del gen *erm*(41) y la región aguas

arriba del mismo que son específicas de especie y pueden ser utilizadas para la diferenciación de los miembros que conforman el complejo *M. abscessus* (Tabla 5). En todos los casos la secuencia nucleotídica generada es comparada con las descritas en las bases de datos del GenBank o RIDOM.

## Técnicas no moleculares

*Técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz utilizada en espectrometría de masas (MALDI-TOF del inglés matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight).* Se basa en la comparación de los patrones de espectrofotometría de masas, principalmente se utilizan las proteínas ribosomales específicas para bacterias y hongos que se comparan con una base de datos (MALDI Biotyper library). Tiene una amplia aceptación en los laboratorios de diagnóstico, ya que permite la caracterización en forma rápida y económica. Se han obtenido buenos resultados en relación con la identificación de especies de *Mycobacterium*, incluyendo MNT. Las limitaciones importantes del método son la falta de optimización en la preparación de la muestra para micobacterias y una base de datos incompleta o no actualizada (32,42).

En el estudio realizado por Kodana et al. (43) se identificaron 75 aislados clínicos de MNT mediante PCR, hibridación ADN-ADN (DDH) y el método MALDI-TOF MS. La identificación de las especies fue concordante en 71 (94,5%) de las 75 cepas, lográndose identificar *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* y *M. chelonae*. Dos aislados mostraron resultados discordantes por el método DDH y por análisis de la secuencia del ARNr16S, los cuales fueron caracterizados como *M. terrae* y *M. arupense*, respectivamente, ambos no pudieron ser identificados por el método MALDI-TOF MS, por lo tanto, la identificación de algunas especies de micobacterias poco frecuentes aún no es posible por este método.

*Pruebas de susceptibilidad in vitro.* Actualmente no hay un consenso sobre las conductas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por especies del complejo *M. abscessus*, de manera que las pruebas de susceptibilidad se han convertido en la herramienta de apoyo fundamental para dirigir la antibióticoterapia más adecuada y eficaz de acuerdo a las características clínicas y epidemiológicas de cada caso (44). La prueba estándar para determinar la susceptibilidad de MCR a los antibióticos es la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de microdilución en caldo (MDC). Este procedimiento de referencia recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) se realiza en placas de 96 pozos con caldo Mueller-Hinton ajustado catiónicamente. La concentración final del inóculo microbiano en cada pozo es de  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL. Los antimicrobianos que el CLSI sugiere ensayar son: macrólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cefoxitina, imipenem, linezolid, tigeciclina, doxiciclina, minociclina y trimetoprima-sulfametoxazol (7,45).

Lee et al. (46) evaluaron la eficacia del método MDC modificado, el cual utiliza el 2,3-difenil-5-tienilo (2)-cloruro de tetrazolio (STC), como un indicador de oxido- reducción que cambia a un color rosado intenso cuando hay crecimiento bacteriano. Con este método se obtuvieron criterios de valoración precisos, la lectura de CIM se realizó con facilidad y la técnica fue de bajo costo. Igualmente, García de Carvalho, et al. (47) realizaron un estudio de microtitulación con resazurina (REMA) comparándolo con la técnica de referencia (MDC) para la determinación de la susceptibilidad a claritromicina en cepas del complejo *M. abscessus*. Los resultados fueron 100% concordantes entre las dos técnicas y el uso de REMA simplificó la lectura de las pruebas.

A pesar de la utilidad del MDC y de ser la técnica de referencia, uno de sus inconvenientes es la dificultad de realizarla en la mayoría de laboratorios asistenciales; la relativa lentitud de los laboratorios de referencia puede ser un inconveniente a la hora de tratar pacientes con enfermedades graves. Es necesario, disponer de un método más accesible y rápido. La técnica comercial E-test, ha resultado ser atractiva para este propósito. Varios estudios han reportado una concordancia del 95% dentro de  $\pm 2 \log_2$  con respecto al MDC (48). Sin embargo, la desventaja se encuentra en la lectura y la reproducibilidad que se originan de las variaciones en el crecimiento de las diferentes micobacterias, particularmente en cuanto al tamaño de las colonias y el tiempo de desarrollo (49).

## Conclusiones

El incremento en la frecuencia de las infecciones por MCR, particularmente, requiere de la atención de los médicos, ya que los cuadros clínicos que pueden causar estas micobacterias pueden ser muy variados en su presentación y severidad. Un diagnóstico equivocado y una terapia inadecuada de las infecciones causadas por especies del complejo *M. abscessus* pueden llevar a la cronicidad de la infección y/o complicaciones graves. Por lo tanto, es importante complementar los hallazgos clínicos con un diagnóstico microbiológico preciso y oportuno, así como determinar la susceptibilidad antimicrobiana para el manejo correcto de las infecciones producidas por el complejo *M. abscessus*.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto.

## Referencias

1. Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. BMC Genomics. 2014 ;15: 359. [Google Scholar] [PubMed]

2. Cho YJ, Yi H, Chun J, Cho SN, Daley CL, Koh WJ, Shin SJ. The genome sequence of '*Mycobacterium massiliense*' strain CIP 108297 suggests the independent taxonomic status of the *Mycobacterium abscessus* complex at the subspecies level. PLoS One. 2013 27;8 [Google Scholar] [PubMed]
3. Lee MR, Sheng WH, Hung CC, Yu CJ, Lee LN, Hsueh PR. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. Emerg Infect Dis. 2015;21: 1638-46. [Google Scholar] [PubMed]
4. 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. [Google Scholar] [PubMed]
5. Petrini B. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. APMIS. 2006; 114: 319-28. [Google Scholar] [PubMed]
6. Medjahed H, Gaillard JL, Reyrat JM. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. Trends Microbiol. 2010;18: 117-23. [Google Scholar] [PubMed]
7. García-Martos P, García-Agudo L. Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30: 192-200. [Google Scholar] [PubMed]
8. Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez-Alfonzo R, Piquero J, Zerpa O, de Waard JH. Infecciones en tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia. ¿Cuánto vale la belleza? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24: 302-6. [Google Scholar] [PubMed]
9. Da Mata Jardín O, Hernández-Pérez R, Corrales H, Cardoso-Leao S, de Waard JH. 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. [Google Scholar] [PubMed]
10. 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. 2016 ;144: 1117-20. [Google Scholar] [PubMed]
11. Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. J Antimicrob Chemother. 2012; 67 :810-8. [Google Scholar] [PubMed]
12. Ramírez A, Da Mata O, Fernádes S, Araque M, de Waard JH. Estudio de la susceptibilidad a los antibióticos de aislados clínicos de *Mycobacterium abscessus*. Reporte preliminar. Rev Soc Ven Microbiol 2013; 33:13-17. [Google Scholar]
13. Ramírez A, de Waard JH, Araque M. Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus* complex clinical isolates from Venezuela. J Glob Antimicrob Resist. 2015;3: 205-9. [Google Scholar] [PubMed]
14. van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med. 2013;34: 103-9. [Google Scholar] [PubMed]
15. Alcaide F, Esteban J. Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28 Suppl 1: 46-50. [Google Scholar] [PubMed]

16. Bhambri S, Bhambri A, Del Rosso JQ. Atypical mycobacterial cutaneous infections. *Dermatol Clin*. 2009;27: 63-73. [Google Scholar] [PubMed]
17. Wentworth AB, Drage LA, Wengenack NL, Wilson JW, Lohse CM. Increased incidence of cutaneous nontuberculous mycobacterial infection, 1980 to 2009: a population-based study. *Mayo Clin Proc*. 2013;88: 38-45 [Google Scholar] [PubMed]
18. Zhang X, Liu W, Liu W, Jiang H, Zong W, Zhang G, Jin P, Wang H. Cutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria: case reports and review of clinical and laboratory aspects. *Acta Derm Venereol*. 2015;95: 985-9 [Google Scholar] [PubMed]
19. Otiégón M, Rodríguez G, Camargoz D, Orozco LC. *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus*: patógenos emergentes. *Biomédica* 1996; 16:217- 38 [Google Scholar]
20. van Ingen J. Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2015;36: 43-54. [Google Scholar] [PubMed]
21. Burillo A, Moreno A, Salas C. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25: 579-86 [Google Scholar] [PubMed]
22. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas a color. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1999
23. den Hertog AL, Daher S, Straetmans M, Scholing M, Anthony RM. No added value of performing Ziehl-Neelsen on auramine-positive samples for tuberculosis diagnostics. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013;17: 1094-9 [Google Scholar] [PubMed]
24. Mougari F, Guglielmetti L, Raskine L, Sermet-Gaudelus I, Veziris N, Cambau E. Infections caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14: 1139-54 [Google Scholar] [PubMed]
25. Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios J. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica [Internet] 2005 [Consultado: 30/06/2016]. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9a.pdf>
26. Whittier S, Olivier K, Gilligan P, Knowles M, Della-Latta P. Proficiency testing of clinical microbiology laboratories using modified decontamination procedures for detection of nontuberculous mycobacteria in sputum samples from cystic fibrosis patients. The Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group. *J Clin Microbiol*. 1997;35: 2706-8 [Google Scholar] [PubMed]
27. Casal M. [What terms can be applied to mycobacteria other than *M. tuberculosis* and *M. leprae*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21: 296-8. [Google Scholar] [PubMed]
28. De Juan Ferré L. Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. [Trabajo Especial de Grado] Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2005 [Google Scholar]
29. Cortes S. Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias atípicas en

- el laboratorio clínico. [Trabajo Especial de Grado] Bogotá: Universidad Javeriana; 2009 [Google Scholar]
30. Godoy M, Orozco L, Hernández C, Da Mata O, de Waard JH, González S. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. Rev Soc Ven Microbiol, 2008; 28: 96-104 [Google Scholar]
31. Cortinas M, Fernández M, Valeta M, Uriarte M, Mogdasy C. Caracterización genotípica de 80 especies de *Mycobacterium* en Uruguay. Rev Med Uruguay 2002; 18:230-38. [Google Scholar]
32. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev. 2014;27: 727-52. [Google Scholar] [PubMed]
33. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, 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. [Google Scholar] [PubMed]
34. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol. 1997;35: 2969-73. [Google Scholar] [PubMed]
35. Shin JH, Cho EJ, Lee JY, Yu JY, Kang YH. Novel diagnostic algorithm using *tuf* gene amplification and restriction fragment length polymorphism is promising tool for identification of nontuberculous mycobacteria. J Microbiol Biotechnol. 2009;19: 323-30. [Google Scholar] [PubMed]
36. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;49: 22-7. [Google Scholar] [PubMed]
37. Choi GE, Chang CL, Whang J, Kim HJ, Kwon OJ, Koh WJ, Shin SJ. Efficient differentiation of *Mycobacterium abscessus* complex isolates to the species level by a novel PCR-based variable- number tandem-repeat assay. J Clin Microbiol. 2011; 49: 1107-9. [Google Scholar] [PubMed]
38. Fernández de Vega FA. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006;24:53-7. [Google Scholar]
39. Kim K, Hong SH, Kim BJ, Kim BR, Lee SY, Kim GN, Shim TS, Kook YH, Kim BJ. Separation of *Mycobacterium abscessus* into subspecies or genotype level by direct application of peptide nucleic acid multi-probe-real-time PCR method into sputa samples. BMC Infect Dis. 2015 11;15: 325. [Google Scholar] [PubMed]
40. Macheras E, Roux AL, Ripoll F, Sivadon- Tardy V, Gutierrez C, Gaillard JL, Heym B. Inaccuracy of single-target sequencing for discriminating species of the *Mycobacterium abscessus* group. J Clin Microbiol. 2009;47: 2596-600. [Google Scholar] [PubMed]
41. Bastian S, Veziris N, Roux AL, Brossier F, Gaillard JL, Jarlier V, Cambau E. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rrl* sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55: 775-81. [Google Scholar] [PubMed]

42. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. PLoS One. 2011;6: e24720. [Google Scholar] [PubMed]
43. Kodana M, Tarumoto N, Kawamura T, Saito T, Ohno H, Maesaki S, Ikebuchi K. Utility of the MALDI-TOF MS method to identify nontuberculous mycobacteria. J Infect Chemother 2016; 22:32-5. [Google Scholar] [PubMed]
44. Esteban J, García-Pedrazuela M, Muñoz-Egea MC, Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. Expert Opin Pharmacother. 2012;13: 967-86. [Google Scholar] [PubMed]
45. 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.
46. Lee SM, Kim Jm, Jeong J, Park YK, Bai GH, Lee EY, Lee MK, Chang CL. 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. [Google Scholar] [PubMed]
47. Garcia de Carvalho NF, Sato DN, Pavan FR, Ferrazoli L, Chimara E. Resazurin Microtiter Assay for Clarithromycin Susceptibility Testing of Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus* Group. J Clin Lab Anal. 2016; 30: 751-5. [Google Scholar] [PubMed]
48. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol. 1995;33: 1760-4. [Google Scholar] [PubMed]
49. García-Agudo L, García-Martos P, Jesús I, Rodríguez-Iglesias M. [Assessment of in vitro susceptibility to antimicrobials of rapidly growing mycobacteria by E-test]. Rev Med Chil. 2009; 137: 912-7. [Google Scholar] [PubMed]

## Notas de autor

**Autor de correspondencia:** Dra. Ana Ramírez, Laboratorio de Microbiología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, prolongación avenida Humberto Tejera, edificio Gonzalo González. Universidad de Los Andes. Mérida, 5101, Venezuela. Tel: +58274-2403437, Fax: +58274-2620474. E-mail: ramirezana@ula.ve

## Información adicional

*Como citar este artículo:* Ramírez A, Araque M. Aspectos clínicos y microbiológicos de las infecciones producidas por el complejo *Mycobacterium abscessus*. *Avan Biomed* 2017; 6: 120-32.

PII: S2477-9369(16)06017-R