

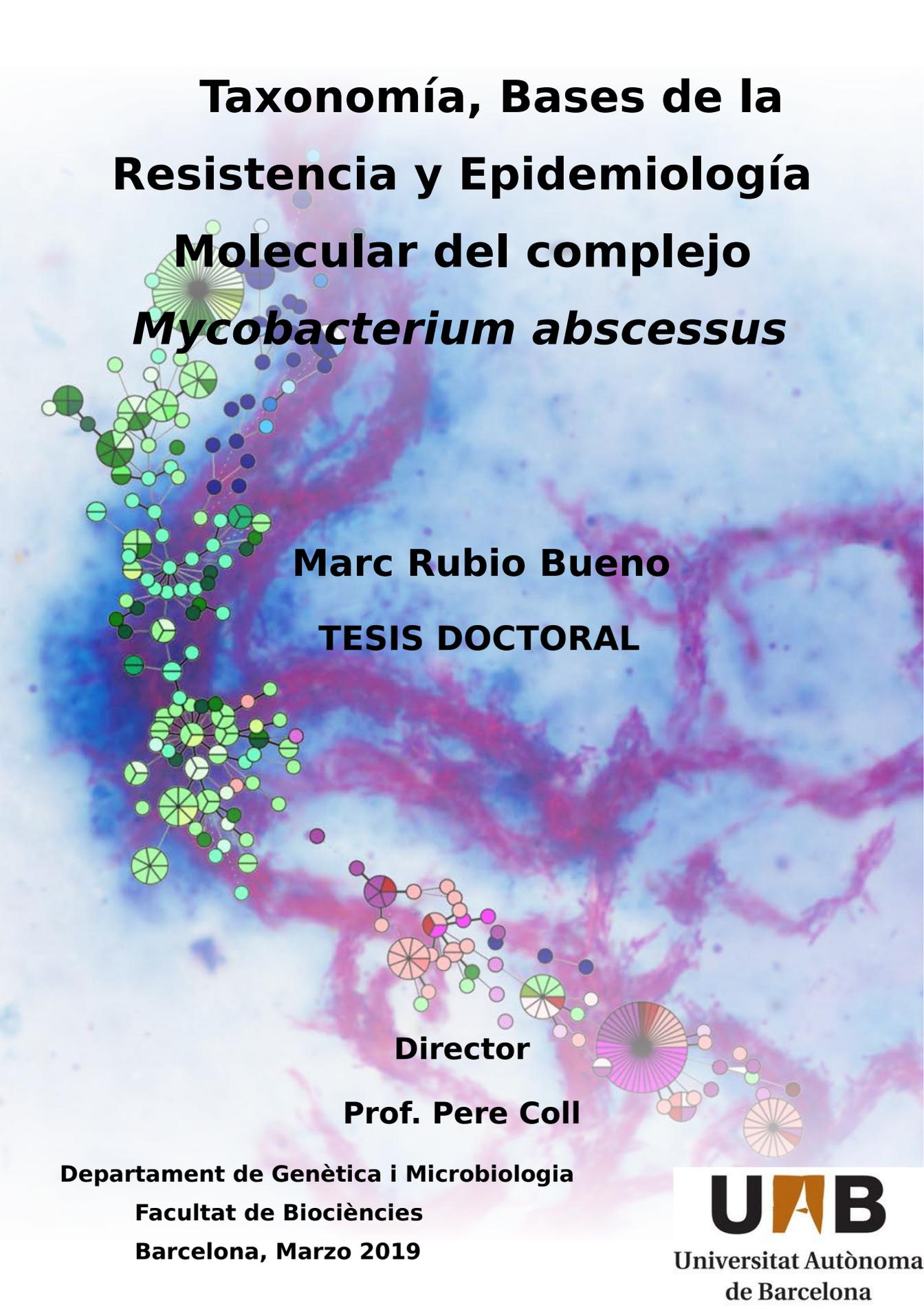


Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Taxonomía, Bases de la  
Resistencia y Epidemiología  
Molecular del complejo  
*Mycobacterium abscessus***

**Marc Rubio Bueno**

**TESIS DOCTORAL**

**Director**

**Prof. Pere Coll**

**Departament de Genètica i Microbiologia**

**Facultat de Biociències**

**Barcelona, Marzo 2019**

**UAB**

**Universitat Autònoma  
de Barcelona**





Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Taxonomía, bases de la resistencia y  
epidemiología molecular del complejo  
*Mycobacterium abscessus***

**TESIS DOCTORAL**

Marc Rubio Bueno

**Director**

Prof. Pere Coll Figa

Departamento de Genética y Microbiología

Facultat de Biociències

Barcelona, Marzo 2019



# **Taxonomía, bases de la resistencia y epidemiología molecular del complejo *Mycobacterium abscessus***

Tesis doctoral presentada por **Marc Rubio Bueno** para optar al grado de doctor en Ciencias en el programa de Doctorado de Microbiología del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona bajo la dirección y tutoría del doctor en medicina Prof. Pere Coll.

Barcelona, 2019



El **Prof. Pere Coll Figa**, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y catedrático de la Universitat Autònoma de Barcelona como director y tutor de la tesis

Certifica que:

La memoria titulada "Taxonomía, bases de la resistencia y epidemiología molecular del complejo *Mycobacterium abscessus*" presentada por **Marc Rubio Bueno** para obtener el grado de doctor en Microbiología, se ha realizado bajo su dirección y tutoría.

Para que así conste, y para los efectos oportunos firma el presente documento en Barcelona, 19 de marzo de 2019

Prof. Pere Coll

**Director y tutor**

Marc Rubio Bueno

**Doctorando**



A todos los que me han apoyado,



# **AGRADECIMIENTOS**



Han pasado cerca de seis años casi sin darme cuenta desde que pise por primera vez el laboratorio, y ha sido una experiencia determinante para mi vida. Dicho lo cuál quisiera agradecer a:

Mi director y tutor de tesis, el Dr. Pere Coll, por los conocimientos brindados, las ávidas discusiones y el tiempo dedicado a mi formación así como por enseñarme a tener un pensamiento crítico y buscar siempre una respuesta, aunque la respuesta sea simplemente que no lo sé y que es necesario estudiar más o que no hay respuesta en este momento. Además por brindarme su apoyo y la oportunidad de desempeñar esta experiencia y ayudarme con todo el trabajo realizado. También agradecerla las largas discusiones envueltas por el humo que han permitido dar vueltas a este trabajo de una forma más distendida e incluso sugerir ideas que luego se han vuelto verdad.

A los facultativos adjuntos del Servicio de Microbiología, en especial al Dr. Ferran Navarro, por su ayuda en las sesiones investigadoras dando su apoyo y conocimiento en diversos temas.

Al Dr. Julià Gonzàlez del Hospital Clínic de Barcelona y la Dra. Teresa Tòrtola del Hospital de la Vall d'Hebron, por prestarnos las cepas con las que hemos podido realizar este trabajo. También al Dr. Julià Gonzàlez por ayudarme en el máster con la técnica de la microdilución.

A la Dra. Wengenack directora del laboratorio de micología y micobacteriología de la Mayo Clinic (Minnesota, Estados Unido) por su ayuda en el apartado de espectrometría de masas utilizando MALDI-ToF.

Al Dr. Shiomi Yoshida del *Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center*, Japón por prestarnos

los perfiles de VNTR para nuestro estudio. Al Dr. Yan Ling Wong del Departamento de Microbiología Médica en la Universidad de Malaya, Kuala Lumpur, Malasia por su ayuda al prestarnos la tabla para calcular las repeticiones en el estudio de VNTR.

También a la Dra. Kathryn Harris Principal Clinical Scientist and CSO WISE Fellow 2016/17, que me acogió en el Great Ormond Street Hospital para poder realizar mi estancia en una institución extranjera. Gracias a ella y a Ronan Doyle, Julianna Brown y Garth Dixon por toda su ayuda con este estudio y sus enseñanzas en cuanto a la secuenciación masiva. Especialmente Ronan, que me acogió dentro y fuera del laboratorio como su padawan. También agradecer a la EMBO, gracias a la short-term fellowship (núm. 7307) con la cual pude realizar mi estancia en Londres.

A Montserrat Garrigó y Carmen Moreno, así como también a Elena García técnicas del laboratorio de Microbiología de Sant Pau que me ayudaron muchísimo en los primeros años del doctorado y me enseñaron a trabajar con micobacterias y siempre me acogen en su parte del laboratorio cuando me ven.

Sobretudo agradecer a mis compañeros del antiguo pabellón 17. Los que me han visto des del principio y verán el final. En especial gracias a los que ya no están en el grupo de investigación, a Paquita que me enseñó la biología molecular de las micobacterias, a Manel que me enseñó en parte la forma de trabajar y siempre se puede contar con él, a Yaide que siempre estaba contenta y dispuesta a ayudar, y a Marc Argente dispuesto siempre a ayudar y con un sentido del humor ácido que se echa de menos.

Gracias a Montse, que me ha enseñado prácticamente todo lo que sé de biología molecular, técnicas y análisis. Gracias Montse por siempre estar disponible para ayudar aun cuando no hay tiempo.

Gracias a Paula, que llegó prácticamente cuando yo al laboratorio y que siempre me ha ayudado y me ha mostrado un poco el camino del investigador. Gracias por hacernos parte de un grupo cuando llegaste y por tus consejos y apoyo.

Gracias a Eli, que siempre está dispuesta a ayudar y viajó conmigo a Gante para aprender a utilizar el BioNumerics cuando aún no sabíamos usarlo.

Gracias a Laura, o Lauri como le gusta que la llamemos que siempre me ha ayudado y me ha escuchado cuando tenía problemas. Gracias por hacer el laboratorio más alegre.

Gracias a Judith, mi compañera de despacho y amiga con la que disfrutábamos de nuestros tiempos de recreo entre humo para hacer un alto en el camino de nuestra jornada. Gracias Judith por soportarme y compartir conmigo esos momentos.

Gracias Anna, que empezamos juntos hace seis años y ya estamos los dos acabando. Gracias por poder hablar siempre de todo y por visitarme en Londres.

Gracias Alba, que has sido la incorporación más reciente en el grupo y siempre consigues compartir parte de tu alegría con todos nosotros.

Por último, agradezco a mi familia, mis padres, hermano, tíos y abuelos su apoyo incondicional en permitirme llegar hasta donde estoy hoy. También a mis amigos de toda la vida, que unos están por aquí y otros fuera pero con los que siempre se puede contar. También agradecer a Álex González por ayudarme con la edición de la portada de la tesis.

Termino agradeciendo a la persona que ha sido, es y será más importante en mi vida, a mi pareja Natalia por su apoyo y paciencia

infinita en este viaje, sin la cuál no podría haberlo conseguido. Gracias por soportarme y aguantarme en los buenos y en los no tan buenos momentos y por no dejar que me pierda sin ti. Gracias cariño por estar.





# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XVII
RESUMEN.....	XXI
SUMMARY.....	XXVII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Género <i>Mycobacterium</i> .....	3
1.2. <i>Mycobacterium abscessus</i> .....	6
1.2.1. Taxonomía.....	6
1.2.2. Nicho ecológico.....	8
1.2.3. Identificación en el laboratorio.....	11
1.2.3.1. Métodos fenotípicos.....	11
1.2.3.2. Métodos proteómicos utilizando MALDI-ToF.....	13
1.2.3.3. Métodos genotípicos utilizando la amplificación y secuenciación de genes estructurales.....	16
1.2.3.4. Secuenciación completa del genoma (WGS).....	20
1.2.4. Patogenia.....	24
1.2.4.1. Infección del tracto respiratorio.....	24
1.2.4.2. Infección de piel y tejidos blandos.....	25
1.2.4.3. Otras infecciones menos comunes causadas por <i>M. abscessus</i> .....	27
1.2.5. Factores de virulencia.....	29
1.2.5.1. Factores de virulencia asociados a la supervivencia intracelular.....	29
1.2.5.2. Factores de virulencia asociados a la infección respiratoria en pacientes con fibrosis quística.....	33
1.2.6. Tratamiento.....	35
1.2.6.1. Macrólidos.....	37
1.2.6.1.1. Estructura química.....	37
1.2.6.1.2. Mecanismo de acción.....	39
1.2.6.1.3. Mecanismos de Resistencia.....	39
I. Resistencia constitutiva.....	39
II. Resistencia inducible.....	40
1.2.6.2. Aminoglucósidos.....	43
1.2.6.2.1. Estructura química.....	43
1.2.6.2.2. Mecanismo de acción.....	44

1.2.6.2.3. Mecanismos de resistencia por mutaciones en la diana (16S).....	45
1.2.6.2.4. Mecanismos de resistencia por mutaciones cerca de la diana (Proteína ribosomal S12).....	45
1.2.6.2.5. Mecanismos de resistencia por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAG).....	46
1.2.6.3. Fluoroquinolonas.....	49
1.2.6.3.1. Estructura química.....	49
1.2.6.3.2. Mecanismo de acción.....	50
1.2.6.3.3. Mecanismo de resistencia por modificación de la diana.....	51
1.2.6.3.4. Otros mecanismos de resistencia: permeabilidad de la membrana y bombas de eflujo.	53
1.2.6.4. Tetraciclinas y glicilciclinas.....	54
1.2.6.4.1. Estructura química.....	54
1.2.6.4.2. Mecanismo de acción.....	55
1.2.6.4.3. Resistencia.....	56
1.2.6.5. Diarilquinolinas (bedaquilina).....	58
1.2.6.5.1. Estructura química.....	58
1.2.6.5.2. Mecanismo de acción.....	58
1.2.6.5.3. Resistencia.....	59
1.2.6.6. Oxazolidinonas (linezolid).....	60
1.2.6.6.1. Estructura química.....	60
1.2.6.6.2. Mecanismo de acción.....	60
1.2.6.6.3. Resistencia.....	61
1.2.6.7. Betalactámicos, cefalosporinas y carbapenémicos.....	64
1.2.6.7.1. Estructura química.....	64
1.2.6.7.2. Mecanismo de acción.....	66
1.2.6.7.3. Mecanismo de resistencia.....	67
1.2.7. Pautas terapéuticas.....	68
1.2.8. Epidemiología.....	71
1.2.8.1. Marcadores moleculares para la tipificación....	74
1.2.8.1.1. PFGE.....	74
1.2.8.1.2. VNTR.....	75
1.2.8.1.3. MLST.....	77
1.2.8.1.4. Secuenciación completa del genoma o WGS.....	79
1.2.8.2. Brotes descritos.....	81
1.2.8.2.1. Brotes asociados a infección cutánea.....	81

1.2.8.2.2. Brotes asociados a infección pulmonar.....	82
2.OBJETIVOS.....	84
I. Identificación:.....	84
II. Resistencia a los antibióticos.....	84
III. Epidemiología molecular.....	84
3.HIPÓTESIS.....	86
4.MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
4.1.Muestras y ámbito de estudio.....	90
4.2.Cultivo de las cepas del complejo <i>M. abscessus</i> .....	92
4.3.Inactivación de las micobacterias.....	92
4.4.Extracción de ADN genómico para PCR.....	93
4.5.Amplificación por PCR.....	93
4.6.Electroforesis de corriente continua en gel de agarosa al 1%.....	93
4.7.Purificación de los productos de PCR.....	94
4.8.Secuenciación de Sanger.....	94
4.9.Análisis de los resultados de secuenciación.....	94
4.10.Identificación de las subespecies del complejo.....	95
4.11.Secuencias de referencia.....	95
4.12.Identificación de micobacterias mediante MALDI-TOF MS .....	96
4.13.Identificación por secuenciación masiva.....	98
4.13.1.Extracción del ADN de alta calidad.....	98
4.13.2.Preparación de la librería genética.....	98
4.13.3.Generación de agrupaciones (Clusters).....	98
4.13.4.Secuenciación.....	99
4.13.5.Identificación de la subespecie utilizando las diferencias de SNPs en el <i>core genome</i> .....	99
4.14.Test de susceptibilidad antibiótica.....	103
4.15.Evaluando las bases genéticas de la resistencia.....	106
4.15.1.Macrólidos.....	106
4.15.2.Aminoglucósidos.....	107
4.15.3.Fluoroquinolonas.....	107
4.15.4.Oxazolidinonas.....	108
4.16.Traducción a proteínas.....	109
4.17.Epidemiología molecular del complejo <i>M. abscessus</i> . 110	
4.17.1.Cálculo del índice de Simpson para el cálculo de la diversidad.....	110
4.17.2.Variable Number of Tandem Repeats.....	110

4.17.2.1. Generación <i>in silico</i> de perfiles de VNTR de genomas públicos.....	112
4.17.2.2. MultiLocus Sequence Typing.....	113
4.17.2.3. Whole Genome Sequencing.....	114
4.17.2.3.1. Análisis de los clusters obtenidos.....	115
4.17.2.3.2. Ensamblaje <i>de novo</i> .....	115
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	118
5.1. Identificación de las subespecies del complejo de <i>M. abscessus</i> .....	119
5.1.1. Utilización de la WGS como técnica de referencia para la identificación.....	119
5.1.2. Identificación basada en secuenciación de múltiples genes.....	122
5.1.3. Identificación basada en MALDI-TOF.....	127
5.2. Resistencia a los antibióticos en el complejo <i>M. abscessus</i> .....	134
5.2.1. Microdilución en caldo Müller-Hinton ajustado de cationes.....	134
5.2.2. Test de sensibilidad antibiótica E-test.....	143
5.2.3. Evaluando las bases genéticas de la resistencia antibiótica.....	145
5.2.3.1. Macrólidos.....	147
5.2.3.1.1. Resistencia inicial.....	148
5.2.3.1.2. Resistencia adquirida.....	152
5.2.3.2. Aminoglucósidos.....	154
5.2.3.2.1. Resistencia inicial.....	154
5.2.3.2.2. Resistencia adquirida.....	159
5.2.3.3. Fluoroquinolonas.....	161
5.2.3.4. Oxazolidinonas.....	165
5.3. Epidemiología molecular del complejo <i>M. abscessus</i> ...170	
5.3.1. Estudio de la variabilidad dentro de <i>M. abscessus</i> 172	
5.3.1.1. Estudio por <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (VNTR).....	173
5.3.1.2. Análisis de las agrupaciones generadas por VNTR en Barcelona.....	176
5.3.1.2.1. <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> .....	176
5.3.1.2.2. <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> y <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> .....	176
5.3.1.3. Análisis de las agrupaciones generadas por VNTR a nivel global.....	178

5.3.1.3.1. <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> .....	180
5.3.1.3.2. <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> .....	180
5.3.1.4. Epidemiología del complejo <i>M. abscessus</i> por MLST ( <i>MultiLocus Sequence Typing</i> ) en Barcelona.....	182
5.3.1.4.1. <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> .....	183
5.3.1.4.2. <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> y <i>M.</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> .....	186
5.3.1.5. Epidemiología del complejo <i>M. abscessus</i> por MLST ( <i>MultiLocus Sequence Typing</i> ) a nivel global.....	188
5.3.1.6. Epidemiología del complejo <i>M. abscessus</i> por secuenciación masiva (WGS).....	192
5.3.1.6.1. Definición de cluster.....	192
5.3.1.6.2. Epidemiología del complejo <i>M. abscessus</i> por WGS.....	195
5.3.1.6.3. Análisis de las cepas ST-1 de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> .....	199
I.Cluster IV del subárbol ST-1.....	199
II.Cluster V del subárbol ST-1.....	200
III.Cluster VI del subárbol ST-1.....	201
IV.Cluster VIII del subárbol ST-1.....	201
5.3.1.6.4. Análisis de las cepas ST-26 de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> .....	204
5.3.1.6.5. Análisis del subarbol ST-23 y ST-48 de <i>M.</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> .....	206
5.3.1.6.6. Análisis de los clusters detectados por MLST en Barcelona ( <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> ST-34 y <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ST-22).....	208
5.3.1.7. Resultados de la combinación de todos los marcadores moleculares.....	211
5.3.1.8. Consideraciones sobre los marcadores moleculares.....	215
5.3.2. Análisis de las cepas obtenidas en el seguimiento de un paciente con infección crónica mediante marcadores moleculares.....	218
6. CONCLUSIONS.....	222
7. REFERENCIAS.....	227
8. ANEXOS.....	257
Anexo I: Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the <i>Mycobacterium abscessus</i> complex.....	259

Anexo II: Whole genome sequencing does not support patient-to-patient as the frequent route of transmission for <i>Mycobacterium abscessus</i> infection in cystic fibrosis patients. .....	269
Anexo III: Protocolos de extracción de ADN.....	295
Anexo IV: Protocolo de amplificación por PCR.....	297
Anexo V: Protocolos de PCR.....	302
Anexo VI: Preparación de librerías genéticas.....	308
Anexo VII: Script para el estudio de <i>M. abscessus</i> por WGS .....	309
Anexo VIII: Protocolo para el estudio de la sensibilidad antibiótica.....	311
Anexo IX: Protocolo para el estudio epidemiológico por VNTR de <i>M. abscessus</i> .....	312
Anexo X: Protocolo para el estudio epidemiológico por MLST de <i>M. abscessus</i> .....	315
Anexo XI: <i>Script</i> para extraer los genes específicos de <i>M.</i> <i>abscessus</i> para obtener el perfil de MLST.....	317
Anexo XII: Tabla de CMIs para todas las cepas estudiadas.	319





# ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1:** Resumen de las diferentes especies descritas clasificadas en función de la velocidad de crecimiento, reservorio y patogenicidad.
- Tabla 2:** Resultados de los métodos bioquímicos utilizados para identificar micobacterias.
- Tabla 3:** Resumen de las pautas terapéuticas según la localización de la infección de *M. abscessus*.
- Tabla 4:** Resumen de los aislamientos de Barcelona utilizados en este estudio.
- Tabla 5:** Descripción de los genes utilizados en la clasificación en subespecies de los organismos pertenecientes al complejo *M. abscessus*.
- Tabla 6:** Secuencias de cepas de referencia de las 3 subespecies del complejo *M. abscessus*.
- Tabla 7:** Cepas utilizadas en los tests de sensibilidad antibiótica.
- Tabla 8:** Puntos de corte para las CMIs utilizados en el artículo de Biehl y *col.* 1995.
- Tabla 9:** Puntos de corte para el estudio de CMIs de *M. abscessus* y *M. chelonae* utilizados en el estudio de Broda y *col.* 2013.
- Tabla 10:** Genes asociados a la resistencia a los macrólidos en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 11:** Genes asociados a la resistencia de los aminoglucósidos en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 12:** Genes asociados a la resistencia de la quinolonas en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 13:** Genes asociados a la resistencia del Linezolid en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 14:** Alelos utilizados en la técnica de VNTR para el complejo *M. abscessus*.

- Tabla 15:** Genomas públicos del complejo *M. abscessus* y sus números de acceso en el GenBank.
- Tabla 16:** Genes utilizados en el análisis de MLST en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 17:** Identificación de las cepas del complejo *M. abscessus* por homología de genes estructurales.
- Tabla 18:** Identificación de 27 cepas de *M. abscessus* de Barcelona mediante MALDI-ToF.
- Tabla 19:** Resultados del test de susceptibilidad antibiótica.
- Tabla 20:** Resultados del test de susceptibilidad antibiótica divididos por subespecies.
- Tabla 21:** Comparación de la epidemiología de la resistencia con otros estudios.
- Tabla 22:** Resultados del test de sensibilidad antibiótica mediante E-test.
- Tabla 23:** Comparación de las técnicas de estudio de sensibilidad antibiótica.
- Tabla 24:** Bases genéticas de la resistencia antibiótica inicial.
- Tabla 25:** Estudio del mecanismo molecular asociado a la resistencia de los macrólidos.
- Tabla 26:** Resistencia adquirida a la claritromicina en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 27:** Mecanismos moleculares asociados a la resistencia inicial a los aminoglucósidos en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 28:** Mecanismos moleculares asociados a la resistencia adquirida a los aminoglucósidos en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 29:** Mecanismo molecular asociado a la resistencia de las fluoroquinolonas en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 30:** Mecanismo molecular asociado a la resistencia del linezolid en el complejo *M. abscessus*.
- Tabla 31:** Análisis de VNTR de las cepas de *M. abscessus* de Barcelona.
- Tabla 32:** Análisis de MLST de las cepas de *M. abscessus* de Barcelona.

**Tabla 33:** Resumen de las diferentes técnicas para el estudio de la epidemiología del complejo *M. abscessus*.

**Tabla 34:** Análisis de las cepas de seguimiento de 4 pacientes de Barcelona.



# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama explicativo de la evolución en Sistemática y taxonomía del complejo *M. abscessus* adaptada de Lee y col.
- Figura 2:** Perfiles proteicos de las 3 subespecies del complejo *M. abscessus* obtenidos por MALDI-ToF.
- Figura 3:** Imagen del anaálisis de RFLP del gen *hsp65* de diferentes NTM.
- Figura 4:** Árbol filogenético de *M. abscessus* y especies cercanas.
- Figura 5:** Radiografía y tomografía de la infección pulmonar causada por *M. abscessus*.
- Figura 6:** Lesiones cutáneas producidas por *M. abscessus* subsp.*abscessus*.
- Figura 7:** Lesiones cutáneas producidas por *M. abscessus* subsp.*abscessus*.
- Figura 8:** Cepas de *M. abscessus* rugosas y lisas.
- Figura 9:** Ejemplos de genes del genoma de *M. abscessus* comparados con los genes de otras micobacterias.
- Figura 10:** Ejemplos de algunos genes encontrados en el genoma de *M. abscessus* con homólogos en otras bacterias no micobacterias.
- Figura 11:** Estructura química de los macrólidos.
- Figura 12:** Estructura del ARN ribosomal 23S dónde se unen los macrólidos.
- Figura 13:** Estructura química de los aminoglucósidos y ejemplos. Imagen tomada de Jana y Deb 2006.
- Figura 14:** Estructura de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (*T. thermophilus*).
- Figura 15:** Estructura química de las quinolonas y fluoroquinolonas.
- Figura 16:** Estructura química de la tetraciclina, doxiciclina, minociclina y tigeciclina.
- Figura 17:** Estructura química de la bedaquilina.
- Figura 18:** Estructura química del linezolid.

- Figura 19:** Estructura química de la nueva oxazolidinona LCB01-0371 (delpazolid).
- Figura 20:** Estructura química de los betalactámicos (A y B), cefalosporinas (C y D) y carbapenémicos (E y F).
- Figura 21:** Imagen de electroforesis de en campo pulsado *M. abscessus*.
- Figura 22:** Representación esquemática del análisis de VNTR de dos cepas hipotéticas.
- Figura 23:** MST obtenido a partir del análisis de MLST de *M. abscessus* utilizando la base de datos del *Institut Pasteur MLST*.
- Figura 24:** Organigrama resumen de los pasos a seguir en un experimento de WGS.
- Figura 25:** Identificación de las cepas de *M. abscessus* por WGS.
- Figura 26:** Distribución de los aislamientos clínicos de *M. abscessus* en las 3 subespecies en Barcelona.
- Figura 27:** Epidemiología de *M. abscessus* en Barcelona por VNTR.
- Figura 28:** Epidemiología global de *M. abscessus* por VNTR.
- Figura 29:** Epidemiología de *M. abscessus* en Barcelona por MLST.
- Figura 30:** Epidemiología global de *M. abscessus* por análisis de MLST.
- Figura 31:** Frecuencia de las distancias de pares entre todos los aislamientos de *M. abscessus*.
- Figura 32:** Distribución de los primeros aislamientos del complejo *M. abscessus* de Londres y Barcelona.
- Figura 33:** Árbol de máxima similitud de las cepas pertenecientes al primer cluster (Cluster ST-1).
- Figura 34:** Árbol de máxima similitud de las cepas pertenecientes al segundo cluster (Cluster ST-26).
- Figura 35:** Árbol de máxima similitud de las cepas pertenecientes al tercer cluster (Cluster ST-23 y ST-48).
- Figura 36:** Árbol de máxima similitud a partir de SNVs de todas las muestras.





# ABREVIATURAS

<b>AAC</b>	N-acetiltranserasa
<b>ABS</b>	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>
<b>AMI</b>	Amicacina
<b>AMR</b>	Mutaciones asociadas a la resistencia antibiótica
<b>AUG</b>	Augmentine
<b>AXO</b>	Ceftriaxona
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BOL</b>	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>CLR</b>	Claritromicina
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratories Standard Institute</i>
<b>CFI</b>	Concentración Inhibitoria Mínima
<b>DOX</b>	Doxiciclina
<b>EMAG</b>	Enzimas Modificadoras de los Aminoglucósidos
<b>FOX</b>	Cefoxitina
<b>FQ</b>	Fibrosis quística
<b>GOS</b>	<i>Great Ormond Street Hospital</i>
<b>GPL</b>	Glicopeptidolípido
<b>HCL</b>	Hospital Clínic de Barcelona
<b>HGT</b>	<i>Horizontal Gene Transfer</i>
<b>HPLC</b>	<i>High-performance Liquid Chromatography</i>
<b>HSP</b>	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
<b>HVH</b>	Hospital de la Vall d'Hebron
<b>IMI</b>	Imipenem
<b>LND</b>	Linezolid
<b>MALDI-ToF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
<b>MAS</b>	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>
<b>MGIT</b>	<i>Mycobacterial Growth Indicator Tube</i>

<b>MIN</b>	Minociclina
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<b>MNT</b>	Micobacterias no tuberculosas
<b>MST</b>	<i>Minimum Spanning Tree</i>
<b>MXF</b>	Moxifloxacino
<b>N/A</b>	No aplicable
<b>N/D</b>	No disponible
<b>PBP</b>	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i>
<b>QRDR</b>	<i>Quinolone Resistant Determining Region</i>
<b>RGM</b>	<i>Rapid Growth Mycobacteria</i>
<b>SGM</b>	<i>Slow Growth Mycobacteria</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>SNV</b>	<i>Single Nucleotide Variant</i>
<b>ST</b>	<i>Sequence Type</i>
<b>STR</b>	Estreptomycin
<b>subsp.</b>	Subespecie
<b>SXT</b>	Trimetoprim-Sulfametoxazol
<b>TIG</b>	Tigeciclina
<b>TOB</b>	Tobramicina
<b>TR</b>	<i>Loci de Tandem Repeat</i>
<b>VNTR</b>	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
<b>WGS</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i>





# RESUMEN



*Mycobacterium abscessus* es un patógeno oportunista emergente perteneciente al grupo de las micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido. El complejo *M. abscessus* está formado por tres subespecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* y *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

*M. abscessus* causa infecciones cutáneas e infecciones pulmonares crónicas en pacientes con factores predisponentes.

*M. abscessus* es resistente a la mayoría de antibióticos. La correcta identificación a nivel de subespecie es imprescindible para optimizar la pauta terapéutica, al existir diferencias en la resistencia antibiótica entre las tres subespecies. Los macrólidos (claritromicina), constituyen la base del tratamiento. La resistencia a los macrólidos, depende en su mayoría de un gen *erm(41)* funcional (polimorfismo 28T) presente en la mayoría de las cepas de la subespecie *abscessus* y en todas las cepas de la subespecie *bolletii*. La subespecie *massiliense* presenta un gen *erm(41)* truncado no funcional.

*M. abscessus*, igual que las demás MNT, tiene un reservorio ambiental del que infecta al huésped susceptible. El reservorio ambiental de *M. abscessus* no es conocido con precisión. Se ha descrito la existencia de clones de *M. abscessus* predominantes en las muestras clínicas de pacientes a nivel mundial. El hecho de que se observen clones predominantes puede deberse a su presencia universal en el ambiente y a que estos clones se seleccionan por su capacidad para infectar al hombre. Se ha propuesto la transmisión interhumana como mecanismo de difusión. El estudio de epidemiología molecular del complejo *M. abscessus* es importante para poder establecer como se difunde.

Hemos estudiado 36 cepas de 33 pacientes de tres hospitales de Barcelona aisladas en un período de 20 años. Para la identificación a nivel de subespecie hemos utilizado el consenso de homología de cuatro genes estructurales; la espectrometría de masas Maldi-ToF; y la secuenciación masiva. Para estudiar la resistencia antibiótica, hemos calculado las CMI<sub>s</sub> de los fármacos mediante microdilución y E-test. Para los mecanismos moleculares asociados a las resistencia hemos estudiado los genes *rrl*, *erm(41)*, *rrs*, *MAB\_3168c*, *rpsL*, *gyrA*, *gyrB*, *rplC*, *rplD* y *rplV*. Para estudiar la epidemiología del complejo hemos utilizado el análisis por VNTR, por MLST y por WGS.

Nuestros resultados muestran que actualmente el Maldi-Tof no es capaz de identificar *M. abscessus* a nivel de subespecie. Por el contrario, la secuenciación de cuatro genes estructurales permite la identificación a nivel de subespecie.

El E-test da resultados menos reproducibles y CMI<sub>s</sub> más elevadas que la microdilución. Los resultados del estudio de resistencia muestran todas las cepas sensibles a tigeciclina y la mayoría sensibles a los aminoglucósidos, pero mayormente resistentes a los demás antibióticos. Las bases moleculares de la resistencia a los macrólidos se encuentran en la presencia de un gen *erm(41)* funcional o en la selección de mutaciones en las posiciones 2057, 2058 o 2059 del gen *rrl*. La mutación A1408G en el gen *rrs* se corresponde con resistencia a los aminoglucósidos. No hemos encontrado las mutaciones descritas como responsables de resistencia a quinolonas y linezolid.

La capacidad discriminativa del VNTR es de 0,045, del MLST de 0,145, y del WGS de 0,034. Hemos observado la existencia de clones predominantes a nivel global. Las agrupaciones moleculares deben

ser verificadas mediante la epidemiología de campo. Los clusters detectados incluyen pacientes no relacionados epidemiológicamente. En función de nuestros resultados, la transmisión interhumana tendría un papel anecdótico en la transmisión de *M. abscessus*. La infección se adquiriría de forma independiente a partir de clones predominantes presentes en el ambiente, explicando la existencia de agrupaciones.

El estudio de varias cepas del mismo enfermo espaciadas en el tiempo muestra que se trata de una infección crónica (mismo clon) y no reinfecciones por clones distintos.



# SUMMARY



*Mycobacterium abscessus* is an emerging opportunistic pathogen belonging to the rapidly growing non-tuberculous mycobacteria. The *M. abscessus* complex is divided into three subspecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

*M. abscessus* complex cause cutaneous infections and chronic pulmonary infections in patients with predisposing factors.

*M. abscessus* is resistant to most antibiotics. The correct identification at the subspecies level is essential to optimize the therapeutic regimen, as there are differences in antibiotic resistance among the three subspecies. Macrolides (clarithromycin) are the key stone for the treatment. Resistance to macrolides, depends mostly on a functional *erm(41)* gene (28T polymorphism) present in many strains of the subspecies *abscessus* and in all strains of the subspecies *bolletii*, but not in the *massiliense* subspecies.

*M. abscessus* like other NTM, has an environmental reservoir from which it infects the susceptible host. The environmental reservoir of *M. abscessus* is not known. Predominant globally circulating clones of *M. abscessus* have been described and interhuman transmission has been proposed as the most common mechanism for spreading. The fact that predominant clones are observed in clinical samples of patients worldwide may be due to their universal presence in the environment and that these clones are selected for their ability to infect humans. The study of molecular epidemiology of the *M. abscessus* complex is important to establish how it spreads.

We used 36 strains isolated from 33 patients from three hospitals in Barcelona over 20 years. For subspecies level identification we used the consensus homology of four housekeeping genes; *mass*

spectrometry by Maldi-ToF; and whole genome sequence. For the drug susceptibility test we calculated the MICs of the antibiotics using microdilution and E-test. For the molecular mechanisms associated with resistance we have studied the *rrl*, *erm(41)*, *rrs*, *MAB\_3168c*, *rpsL*, *gyrA*, *gyrB*, *rpIC*, *rpID* and *rpIV* genes. For the study of the epidemiology of the complex, we used the VNTR analysis, the MLST analysis and the WGS analysis.

Our results show that identification by Maldi-Tof is currently unable to identify the members of the complex at the subspecies level. In contrast, the sequencing of four structural genes allows identification at the subspecies level.

The E-test gives less reproducible results and higher MICs than microdilution. The results of the DST show all strains sensitive to tigecycline and most sensitive to aminoglycosides, but mostly resistant to other antibiotics. The molecular basis of resistance to macrolides is found in the presence of a functional *erm(41)* gene or in the selection of mutations at positions 2057, 2058 or 2059 of the *rrl* gene. The mutation A1408G in the *rrs* gene is responsible to high level resistance to aminoglycosides. We have not found the mutations described for resistance to quinolones and linezolid.

The discriminative capacity of the VNTR is 0.045, the MLST is 0.145, and the WGS is 0.034. We have observed the existence of predominant clones globally. Molecular clusters should be verified by field epidemiology. The detected clusters include patients not epidemiologically related. Based on our results, interhuman transmission would have an anecdotal role in the transmission of *M. abscessus*. The infection would be acquired independently from

predominant clones present in the environment, explaining the existence of clusters.

The study of several strains isolated from the same patient spaced in time shows that the infection is a chronic infection (caused by the same clone) and not reinfections by different clones.



# 1. INTRODUCCIÓN

“Pleased to meet you, hope you guess my name...”. *Mycobacterium abscessus* es un patógeno formidable y difícil de tratar con múltiples mecanismos de resistencia antibiótica [1].

“*Mycobacterium abscessus* un nuevo jugador en el campo de las micobacterias” [2].

“You can’t always get what you want”. Las tres subespecies del complejo responden de forma muy diferente a los distintos antibióticos. Lo ideal sería identificar los aislamientos a nivel de subespecie para administrar mejor el régimen de fármacos y determinar la funcionalidad de los genes de resistencia [3].



## 1.1. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece al grupo de los actinomicetos. Las micobacterias son microorganismos dispersos por todos los ambientes. Aunque la gran mayoría de las especies que pertenecen a este género son saprófitos medioambientales inofensivos, o en algunos casos patógenos oportunistas, algunos han evolucionado hasta convertirse en patógenos humanos muy relevantes como *Mycobacterium tuberculosis* (causante de alrededor de 1,4 millones de muertes en el año 2015) o *Mycobacterium leprae* [4]. Tanto *M. tuberculosis* como *M. leprae* tienen un reservorio humano. En Microbiología Clínica se habla de *M. tuberculosis* complex, *Mycobacterium leprae* y al resto de las especies se las denomina micobacterias no tuberculosas (MNT). En el complejo *M. tuberculosis* se incluyen las siguientes especies que tienen hábitats animales distintos: *M. tuberculosis* (humanos), *M. africanum* (humanos), *M. oryx* (antílopes, orixes, ciervos, gacelas, etc.), *M. bovis* (ganado, humanos y otros mamíferos), *M. microti* (roedores como el campañol, también afecta a humanos), *M. canettii* (humanos), *M. caprae* (humanos, cerdos, cabras, ciervos, jabalíes y ganado), *M. pinnipedii* (pinnípedos como las focas y leones marinos), *M. suricattae* (suricatos) y *M. mungi* (mangostas rayadas) [5-12]. En la actualidad el género *Mycobacterium* consta de alrededor de 197 especies (datos obtenidos de <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). Las micobacterias tienen una pared bacteriana formada por peptidoglucano, arabinogalactano y ácidos micólicos unidos a

éste. Están caracterizados por un alto contenido en G+C en su genoma y una envuelta celular rica en lípidos. El alto contenido en G+C (alrededor al 66%) las sitúa filogenéticamente cerca de las bacterias grampositivas de alto contenido en G+C. Pero las micobacterias tienen una envuelta celular estructuralmente diferente, que ha mostrado tener una membrana interna y otra externa (mycomembrana) más semejante en organización a las envueltas de bacterias gramnegativas [4]. Son aerobias y no móviles, con la excepción de *Mycobacterium marinum* que ha mostrado motilidad entre macrófagos [13].

En 1965 Runyon divide a las micobacterias en función de la velocidad de su crecimiento y la formación de pigmentos carotenoides [14]. En función de la velocidad de crecimiento, las micobacterias se pueden dividir como crecedoras lentas o SGM (de sus siglas en inglés: Slow Growing Mycobacteria) y crecedoras rápidas o RGM (de sus siglas en inglés: Rapid Growing Mycobacteria). Las SGM crecen en el laboratorio a partir de los 7 días de cultivo líquido a partir de un cultivo positivo mientras que las RGM crecen antes de los 7 días [15]. En función de la formación de pigmento las micobacterias se dividen en no cromógenas, fotocromógenas y escotocromógenas.

En la Tabla 1 se recogen las diferentes especies descritas clasificadas en función de la velocidad de crecimiento, reservorio y patogenicidad.

**Tabla 1.** Resumen de las diferentes especies descritas clasificadas en función de la velocidad de crecimiento, reservorio y patogenicidad. Datos adaptados de [www.bacterio.net/mycobacterium.html](http://www.bacterio.net/mycobacterium.html) y Tortoli y col. 2014 [16].

<b>Micobacterias de crecimiento rápido (RGM)</b>			
<b>Asociadas a enfermedades humanas</b>		<b>Nunca o raramente asociadas a enfermedades humanas</b>	
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> (1953) <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (2004) <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (2006) <i>M. bacteremicum</i> (2010) <i>M. chelonae</i> (1923) <i>M. fortuitum</i> (1938) <i>M. franklinii</i> (2011) <i>M. immunogenicum</i> (2001) <i>M. iranicum</i> (2013) <i>M. monacense</i> (2006) <i>M. mucogenicum</i> (1995) <i>M. novocastrense</i> (1997) <i>M. preregrinum</i> (1962) <i>M. setense</i> (2008) <i>M. wolinskyi</i> (1999)		<i>M. agri</i> (1972) <i>M. aichiense</i> (1973) <i>M. alvei</i> (1992) <i>M. arabiense</i> (2014) <i>M. aromaticivorans</i> (2009) <i>M. aubagnense</i> (2006) <i>M. aurum</i> (1966) <i>M. austroafricanum</i> (1983) <i>M. boenickei</i> (2004) <i>M. conceptionense</i> (2006) <i>M. brisbanense</i> (2004) <i>M. brumae</i> (1993) <i>M. canariense</i> (2004) <i>M. chitae</i> (1967) <i>M. chlorophenolicum</i> (1986) <i>M. chubuense</i> (1973) <i>M. confluentis</i> (1992) <i>M. cosmeticum</i> (2004) <i>M. diernhoferi</i> (1965) <i>M. duvalii</i> (1971)	
<b>Asociadas a enfermedades en animales</b> <i>M. bourgeoisii</i> (2013) <i>M. elephantis</i> (2000) <i>M. porcinum</i> (1983) <i>M. salmoniphillum</i> (2007)		<i>M. fallax</i> (1983) <i>M. flavescens</i> (1962) <i>M. frederiksbergense</i> (2001) <i>M. gadium</i> (1974) <i>M. gilvum</i> (1971) <i>M. goodii</i> (1999) <i>M. hassiacum</i> (1997) <i>M. hodleri</i> (1996) <i>M. holsaticum</i> (2002) <i>M. houstonense</i> (2004) <i>M. litorale</i> (2012) <i>M. llatzerense</i> (2008) <i>M. komossense</i> (1979) <i>M. madagascariense</i> (1992) <i>M. mageritense</i> (1997) <i>M. monacense</i> (2006) <i>M. moriokaense</i> (1986) <i>M. murale</i> (1999) <i>M. neoaurum</i> (1972) <i>M. neworleansense</i> (2004)	
<i>M. obuense</i> (1971) <i>M. pallens</i> (2009) <i>M. parafortuitum</i> (1965) <i>M. phlei</i> (1899) <i>M. phocaicum</i> (2006) <i>M. poriferarum</i> (1987) <i>M. psychrotolerans</i> (2004) <i>M. pulveris</i> (1983) <i>M. pyrenivorans</i> (2004) <i>M. rhodesiae</i> (1971) <i>M. sediminis</i> (2014) <i>M. senegalense</i> (1973) <i>M. septicum</i> (2000) <i>M. smegmatis</i> (1889) <i>M. sphagni</i> (1980) <i>M. thermoresistibile</i> (1966) <i>M. tokaiense</i> (1973) <i>M. vaccae</i> (1964) <i>M. vanbaalenii</i> (2002)			
<b>Micobacterias de crecimiento lento (SGM)</b>			
<b>Especies con reservorio en mamíferos</b>		<b>Especies con reservorio ambiental patógenas para el ser humano</b>	
<b>Patógenos para el ser humano</b>			
<i>M. africanum</i> (1969) <i>M. bovis</i> (1970) <i>M. canettii</i> (1997) <i>M. caprae</i> (1999) <i>M. leprae</i> (1880) <i>M. lepromatosis</i> (2008) <i>M. microti</i> (1957) <i>M. tuberculosis</i> (1883)		<i>M. alsiensis</i> (2007) <i>M. arosiensis</i> (2008) <i>M. asiaticum</i> (1971) <i>M. avium</i> (1901) <i>M. bohemicum</i> (1998) <i>M. branderi</i> (1995) <i>M. celatum</i> (1993) <i>M. colombiense</i> (2006) <i>M. conspicuum</i> (1996) <i>M. genavense</i> (1993) <i>M. haemophilum</i> (1962)	
<b>Patógenos para otros animales</b>		<i>M. heidelbergense</i> (1998) <i>M. interjectum</i> (1993) <i>M. intermedium</i> (1993) <i>M. intracellulare</i> (1949) <i>M. kansasii</i> (1979) <i>M. malmoense</i> (1977) <i>M. marinum</i> (1926) <i>M. marseillense</i> (2009) <i>M. nebraskense</i> (2004) <i>M. paraffinicum</i> (2009) <i>M. parascrofulaceum</i> (2004)	
<i>M. pinnipedii</i> (2003) <i>M. lepraemurium</i> (1912) <i>M. liflandii</i> (2004) <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (1923)		<b>Especies con reservorio ambiental asociadas a enfermedades en animales</b> <i>M. farcinogenes</i> (1973) <i>M. pseudoshottsii</i> (2005) <i>M. shottsii</i> (2003) <i>M. stomatepieae</i> (2007)	
<b>Nunca o rara vez asociadas a enfermedades humanas</b>			
<i>M. arupense</i> (2006) <i>M. botniense</i> (2000) <i>M. cooki</i> (1990) <i>M. chimaera</i> (2004) <i>M. doricum</i> (2001) <i>M. engbaekii</i> (2013) <i>M. florentinum</i> (2005) <i>M. gastris</i> (1966) <i>M. gordoniae</i> (1962)			
<i>M. heckeshornense</i> (2001) <i>M. heraklionense</i> (2013) <i>M. hiberniae</i> (1993) <i>M. indicus pranii</i> (2009) <i>M. koreense</i> (2012) <i>M. kubicae</i> (2000) <i>M. kumamotoense</i> (2007) <i>M. lacus</i> (2002) <i>M. lentiflavum</i> (1996)			
<i>M. montefiorensis</i> (2003) <i>M. minnesotense</i> (2013) <i>M. noviomagense</i> (2009) <i>M. nonchromogenicum</i> (1965) <i>M. palustre</i> (2002) <i>M. paragordoniae</i> (2014) <i>M. parakoreense</i> (2013) <i>M. paraseoulense</i> (2010) <i>M. paraterrae</i> (2010)			
<i>M. riyadhense</i> (2009) <i>M. senuense</i> (2008) <i>M. seoulense</i> (2007) <i>M. shinjuense</i> (2011) <i>M. terrae</i> (1966) <i>M. triviale</i> (1970) <i>M. tusciae</i> (1999) <i>M. vulneris</i> (2009) <i>M. yongonense</i> (2013)			

## 1.2. *Mycobacterium abscessus*

### 1.2.1. Taxonomía

*Mycobacterium abscessus* fue aislado por primera vez en 1953 por Moore y Frerichs [17] en un absceso en el glúteo de una paciente de 63 años que había sufrido una lesión en la rodilla de niña y sufría una infección diseminada 48 años después. En 1953, cuando se describió por primera vez, se denominó *Mycobacterium abscessus* [18].

En 1972, Kubica y col. agruparon a *M. abscessus* y *M. chelonae*, dos especies muy próximas entre ellas, en el complejo *M. chelonae* [18,19].

En 1992 se reclasificó *M. abscessus* como una nueva especie y fue separado de *M. chelonae* [20].

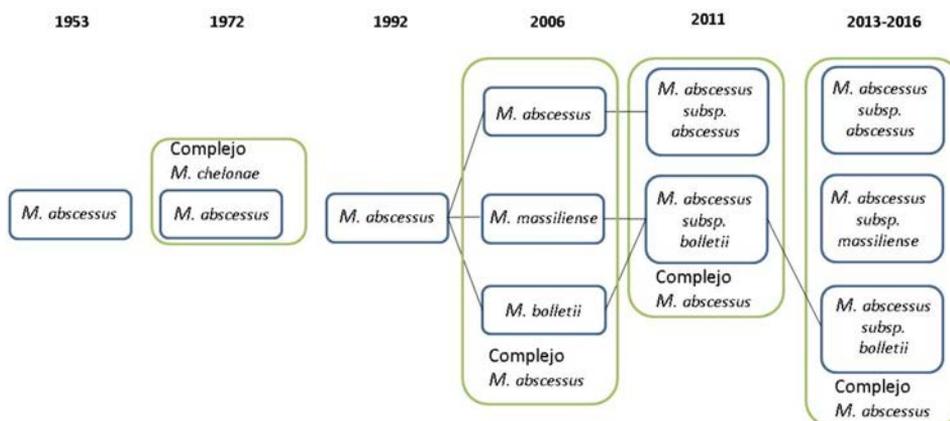
En 2004 y 2006 se describieron *Mycobacterium massiliense* y *Mycobacterium bolletii* respectivamente, que se incluyeron con *M. abscessus* en el complejo *Mycobacterium abscessus* [21,22].

En 2011, *Mycobacterium abscessus* es descrito como un complejo formado por 2 subespecies: *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* (anteriormente *Mycobacterium abscessus*) y *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* (anteriormente *Mycobacterium bolletii* y *Mycobacterium massiliense*) [23].

En 2016 Tortoli y col. utilizando la secuenciación masiva vuelven a dividir el complejo en 3 subespecies: *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp.

*bolletii* y *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* [24]. Estudios anteriores también refrendaban esta división [25–28].

**Figura 1.** Diagrama explicativo de la evolución en sistemática y taxonomía del complejo *M. abscessus* adaptada de Lee y col. [18].



En 2018, Gupta y col. han propuesto un cambio en la nomenclatura no sólo de *Mycobacterium abscessus* sino de la inmensa mayoría de las micobacterias. Han realizado un estudio del género *Mycobacterium*, utilizando datos de los análisis genómicos y filogenéticos de 150 miembros del género y 6 miembros de géneros cercanos. Han propuesto dividir el género *Mycobacterium* en 5 nuevos géneros con lo que *Mycobacterium abscessus* y sus subespecies quedaría en el género *Mycobacteroides* y pasaría a llamarse *Mycobacteroides abscessus* [29]. *Mycobacteroides abscessus* incluiría las tres subespecies descritas.

En esta tesis, dado que la propuesta de Gupta no ha sido validada por el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* continuaremos utilizando la nomenclatura aceptada hasta la fecha: *Mycobacterium*

*abscessus* subsp. *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* y *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*.

*Mycobacterium abscessus* es un patógeno emergente. Los estudios sobre la epidemiología de *M. abscessus* previos al 2015 adolecen de la limitación de la correcta identificación de las subespecies. Muchos estudios se refieren al complejo *M. abscessus* dentro del grupo *M. chelonae/abscessus* o RGM. En Estados Unidos por ejemplo, las infecciones de *M. abscessus/chelonae* suponen entre el 2,6% y el 13% de todas las infecciones pulmonares causadas por micobacterias. Pero en Taiwán, *M. abscessus* corresponde al 17,6% de los aislamientos de NTM causantes de infección [18]. La proporción entre *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *massiliense* es similar entre todos los aislamientos clínicos, mientras que *M. abscessus* subsp. *bolletii* se aísla en ocasiones contadas [30,31]. Las tres subespecies existen a nivel global [32].

### **1.2.2. Nicho ecológico**

Por lo general, las infecciones causadas por NTM son adquiridas de reservorios del entorno como el suelo y el agua. No se transmiten entre humanos y tampoco de animales a humanos. Las infecciones por NTM suelen ocurrir en pacientes que tienen factores predisponentes. Las infecciones pulmonares se observan en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasias, fibrosis quística (FQ), etc. o pacientes con antecedentes de tuberculosis pulmonar [33,34].

El complejo *M. abscessus* es una colección de organismos ubicuos que se encuentran en el agua y el suelo alrededor del mundo [35].

La presencia de agrupaciones de genes y operones involucrados en la resistencia al arsénico o que codifican para desulfurasas son marcas claras de un organismo que vive en el suelo o en ambientes acuáticos. Aunque *M. abscessus* también contiene un gran número de genes de supervivencia intracelular y también contiene genes que le permiten obtener energía mediante la degradación de lípidos derivados de huéspedes eucariotas. Estas características junto con la poca versatilidad metabólica que posee sugieren una tendencia a la especialización en un estilo de vida intracelular. La hipótesis más plausible es que *M. abscessus* ha evolucionado para escapar a los depredadores presentes en su mismo ecosistema, como las amebas de vida libre [21,36]. Estas amebas suelen abundar en interfases entre suelo y plantas donde se alimentan de los parásitos de las plantas como pueden ser algunas bacterias. Plausible con la hipótesis anterior, el genoma de *M. abscessus* contiene diferentes genes de resistencia a ácidos salicílicos, que son productos de defensa de las plantas frente a las bacterias parásitas. Todo esto sugiere que *M. abscessus* vive muy próximo a las plantas y, como se ha comentado tiene una tendencia a la especialización de vida intracelular. La presencia de un plásmido de resistencia al mercurio casi idéntico al plásmido presente en *M. marinum* también hace suponer que ambos microorganismos comparten nicho ecológico y han compartido

de alguna forma su material genético [36]. Además existen estudios en los que se aísla *M. abscessus* en el agua potable y en el agua de los hospitales [37–39]. El estudio publicado en 2017 de Baker y col. muestra un brote causado por la contaminación del agua por *M. abscessus* solucionado tras realizar algunos cambios en el sistema de agua del hospital [37].

De todas formas, la vía de transmisión de *M. abscessus* que causa infección pulmonar no es conocida. El estudio de Malcolm y col. de 2017 [40] muestra como *M. abscessus* no solo es capaz de crecer en fómites (cualquier objeto o material inerte y sin vida que es capaz de transportar organismos patógenos), sino que su crecimiento es mayor en presencia de partículas como el caolín (mineral arcilloso muy abundante en la naturaleza) y el polvo. En su estudio observan como la viabilidad de las micobacterias durante periodos en condiciones secas mejora en presencia de polvo del hogar. La capacidad de *M. abscessus* de crecer en el polvo de casa y de aguantar mejor la desecación en estas partículas sugiere no solo un nicho ecológico sino una nueva forma de transmisión. Aunque se ha sugerido la transmisión entre pacientes de *M. abscessus*, esto podría ser propio de algunas cepas y la mayor parte de infecciones deben de tener una fuente ambiental.

Por otro lado, en relación a las infecciones cutáneas causadas por *M. abscessus*, se requiere una inoculación para causar infección. Las formas más comunes de adquisición de infección cutánea de *M. abscessus* son los tatuajes, la mesoterapia, cirugía plástica o remodeladora, el contacto directo con

material contaminado o descontaminado de forma ineficaz a través de una lesión traumática o a través de la herida quirúrgica. Otra forma de infección cutánea es la infección diseminada por *M. abscessus* que acaba afectando a la piel y tejidos blandos de forma secundaria [18,41].

### **1.2.3. Identificación en el laboratorio**

La discriminación fenotípica entre las subespecies que conforman el complejo es imposible. Diferenciar fenotípicamente a los miembros del complejo *M. abscessus* de especies cercanas como *Mycobacterium chelonae* es también imposible. En estos momentos, la forma más precisa para su identificación es mediante la amplificación y secuenciación de genes estructurales esenciales (*housekeeping genes*) como los genes *rpoB*, *secA1*, *sodA*, *recA*, o *hsp65*. Es imprescindible utilizar más de un gen para su identificación. Las subespecies del complejo son muy cercanas y existe evidencia de transferencia horizontal de genes entre ellas, por tanto, la identificación es el consenso del resultado de varios genes [42,43].

#### **1.2.3.1. Métodos fenotípicos**

Como se ha mencionado previamente, la diferenciación fenotípica del complejo *M. abscessus* es imposible. La llegada de las últimas técnicas de identificación de microorganismos como la amplificación y secuenciación de diferentes genes o el MALDI-TOF han cambiado la forma de identificar las micobacterias. Tradicionalmente, la identificación en el

laboratorio de las RGM se basaba en la velocidad de crecimiento en cultivo, la pigmentación, la morfología de las colonias y una selecta batería de pruebas bioquímicas. Estas pruebas bioquímicas incluían pruebas de producción de arilsulfatasa, pruebas de tolerancia de crecimiento en un cultivo al 5% de NaCl, actividad frente a la nitrato reductasa y la capacidad de captación de hierro. *M. abscessus* muestra una reacción muy positiva a la reacción de la arilsulfatasa a los 3 días, también muestra buena tolerancia al crecimiento en 5% de NaCl. De todas maneras, las recomendaciones que se dan es que se sustituyan las pruebas bioquímicas por las pruebas de biología molecular para la identificación de micobacterias en el laboratorio [44].

Otro método utilizado tradicionalmente en la identificación de SGM es la cromatografía líquida de alto rendimiento de los ácidos micólicos o HPLC (de sus siglas en inglés *High-performance liquid chromatography*). Pero en el caso de las RGM no ha mostrado buenos resultados [45]. En el caso de *M. abscessus*, la HPLC no es capaz de diferenciarlo de *M. chelonae*, por lo que no se recomienda su utilización para la identificación de *M. abscessus* [46].

**Tabla 2.** Resultados de los métodos bioquímicos utilizados para identificar micobacterias. Tabla adaptada de *Manual of Clinical Microbiology 11th edition* [45] y Bhalla y col. 2018 [47].

Test bioquímico	RGM				SGM
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. intracellulare</i>
Acumulación de Niacina	-	+	-	-	-
Arilsulfatasa	+	+	+	-	-
Reducción del nitrato	-	-	+	+	-
Catalasa termoestable	+	+	+	+	-
Alta actividad catalasa	+	+	+	+	-
Baja actividad catalasa	-	-	-	-	+
Hidrólisis de Tween-80	N/A	N/A	+	+	-
Utilización del citrato	-	+	-	+	N/A
Captación de Hierro	-	-	+	+	-
Hidrólisis de la urea	+	+	+	N/A	-
Crecimiento en 5% de NaCl	+	+	+	+	-
Crecimiento en agar McConkey sin cristal violeta	+	-	+	N/A	N/A
Reducción de la telurita	+	+	+	N/A	+

\* Algunas cepas

Abreviaciones: N/A No aplica

### 1.2.3.2. Métodos proteómicos utilizando MALDI-ToF

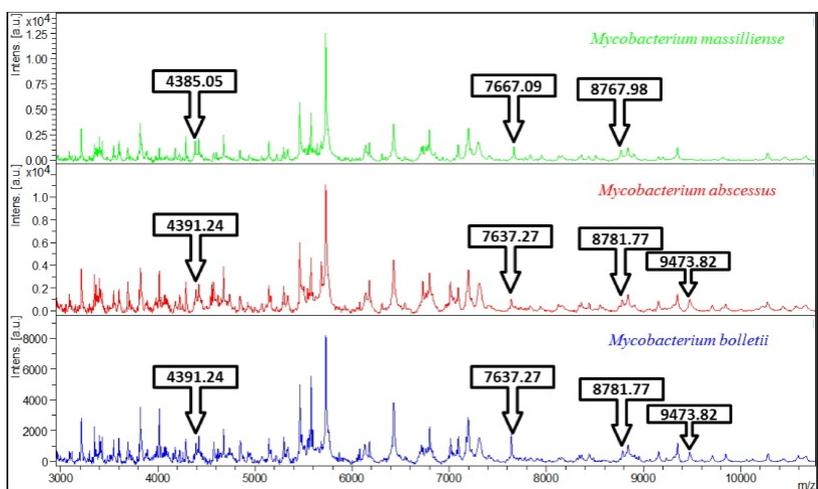
La técnica de *Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDI-ToF) está basada en la espectrometría de masas. Utiliza los diferentes pesos moleculares de las proteínas para crear espectros únicos y comparables entre ellos con el fin de, entre otras funciones, identificar los diferentes microorganismos.

Es una técnica que durante los últimos años se ha establecido en los laboratorios de microbiología clínica dadas sus ventajas frente a las técnicas convencionales. Es un avance tecnológico fidedigno y rápido, permite la mayoría de identificaciones de RGM en 90 minutos [45]. La tecnología de MALDI-ToF es una alternativa más barata, excluyendo la inversión inicial, a la amplificación y secuenciación de genes estructurales para la identificación de RGM.

El MALDI-ToF identifica a nivel de especie y en la literatura encontramos diferentes artículos que aseguran la posibilidad de identificar los complejos a nivel de subespecies. En cuanto al complejo *M. abscessus*, es capaz de diferenciarlo de otras micobacterias y algunos autores aseguran ser capaces de diferenciar entre las 3 subespecies del complejo [48-51]. La figura 2 muestra los 3 perfiles obtenidos por MALDI-ToF de las tres subespecies del complejo *M. abscessus*.

La parte más laboriosa de la técnica, cuando se utiliza para identificar micobacterias u otros organismos con paredes celulares difíciles de romper, es la extracción proteica. Para ello es imprescindible utilizar perlas de circonia o vidrio con la ayuda de un homogenizador.

**Figura 2.** Perfiles proteicos de las 3 subespecies del complejo *M. abscessus* obtenidos por MALDI-ToF. Imagen tomada de Suzuki y col. 2015 [51].



Los números en los recuadros con la flecha indican los picos determinantes para la diferenciación entre las 3 subespecies.

Actualmente, existen dos sistemas de MALDI-ToF ámpliamente utilizados; El Bruker *Biotyper* (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) y el bioMérieux Vitek MS (bioMérieux, Darham, Marcie-l'Étoile, Francia). Ambos sistemas contienen una biblioteca de perfiles proteicos de RGM y algoritmos de identificación para la detección de patrones de picos obtenidos mediante sus protocolos específicos para la identificación de RGM. Aunque las publicaciones previamente citadas y los nuevos trabajos que se están realizando con MALDI-ToF [52] intentan optimizar la extracción proteica de las micobacterias complementando los métodos de extracción utilizados en los protocolos comerciales. Aunque la identificación de bacterias por MALDI-ToF es capaz de diferenciar entre un gran número de especies, cuando se trata de diferenciar entre subespecies de RGM pertenecientes al mismo complejo (diferenciar el complejo *M. abscessus* o diferenciar entre *M. phocaicum* de *M. mucogenum*) no existe aún un protocolo estandarizado con resultados fehacientes [45].

De todas formas, la identificación de microorganismos por MALDI-ToF es una técnica muy reciente que ha conseguido establecerse en los laboratorios clínicos de todo el mundo con una buena proyección de futuro. Aunque la identificación de RGM, especialmente la diferenciación de las subespecies de un mismo complejo, no se puede igualar a la especificidad que muestra la amplificación y secuenciación de genes estructurales, se están haciendo grandes avances en ese sentido en los estudios más recientes. La mejora de las bases de datos públicas de micobacterias, la importancia de la

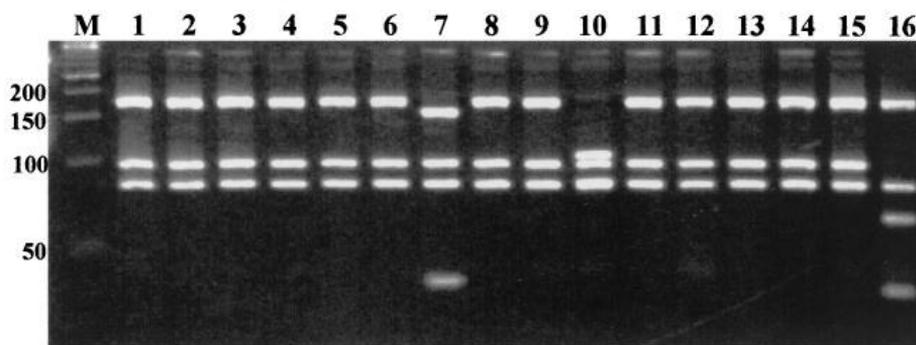
estandarización del método más idóneo de extracción proteica y la mejora de los algoritmos de comparación de perfiles, son algunos aspectos que se deben mejorar para poder utilizar el MALDI-ToF para la identificación de RGM en los laboratorios clínicos.

### 1.2.3.3. Métodos genotípicos utilizando la amplificación y secuenciación de genes estructurales

En 1992 Kusunoki y Ezaki se basaron en la hibridación de ADN genómico realizada por Lévy-Frebault y *col.* en 1986 para demostrar que *M. abscessus* era una especie diferente de *M. chelonae* [20,53].

En 1999 Hernandez y *col.* describieron la técnica de análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos restricción (RFLP) del gen *hsp65* utilizando la electroforesis florescente en capilar para la identificación de micobacterias [54]. Los resultados que publicaron daban una buena especificidad en los amplicones y una buena sensibilidad que permitían utilizar esta técnica directa de identificación de NTM.

**Figura 3.** Imagen del análisis de RFLP del gen *hsp65* de diferentes NTM. Imagen tomada de Lee y *col.* 2000 [55].



La línea 10 corresponde a *M. abscessus*.

El análisis de la secuencia del 16S, el gen más estandarizado en taxonomía, no permite la diferenciación entre las 3 subespecies del complejo. Tampoco es capaz de diferenciar a los miembros del complejo *M. abscessus* de especies micobacterianas cercanas como *M. chelonae* o *M. immunogenum*.

*M. abscessus* únicamente se diferencia de *M. chelonae* por 4 pares de bases en la región A hipervariable del 16S. De hecho, estas dos especies son un ejemplo de especies de micobacterias diferentes que tienen un gen 16S prácticamente idéntico. En el caso de *M. immunogenum*, una micobacteria de crecimiento rápido también cercana a ambas especies, la secuencia del 16S difiere en 8 pares de bases de *M. abscessus* y en 10 pares de bases de *M. chelonae* [35]. La amplificación y secuenciación del ADN ribosómico de la subunidad 16S no permite pues diferenciar las subespecies del complejo *M. abscessus*, pero tampoco permite diferenciar *M. abscessus* de *M. chelonae* o de *M. immunogenum*.

El análisis de un fragmento del gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa de la micobacterias ha sido y sigue siendo el gen de elección para la identificación de RGM. El análisis de la secuencia del gen *rpoB* permite la discriminación que el análisis de la secuencia del 16S no es capaz [44,56].

El análisis del gen *rpoB* es capaz de diferenciar entre las 3 subespecies en el complejo *M. abscessus* [22]. Pero la publicación de Macheras y col. [43] muestra como la utilización

únicamente de este gen puede llevar a una incorrecta identificación de las subespecies del complejo. Porque aunque el gen *rpoB* es capaz de diferenciar entre las 3 subespecies, se ha demostrado la existencia de transferencia horizontal de genes o HGT (de sus siglas en inglés *Horizontal Gene Transfer*) entre las 3 subespecies. En este caso el gen *rpoB*, el gen más utilizado para la identificación de NTM, no está exento de sufrir HGT con lo que la utilización de un único gen para la correcta identificación puede llevar a una identificación errónea.

Se creía que todas las micobacterias mostraban una evolución clonal igual a la observada en los estudios de *M. tuberculosis*. Tenían un genoma que sufría cambios únicamente por mutación y delección. La publicación de Ripoll y col. de 2009 [36] junto con publicaciones posteriores, muestran una creciente evidencia de la existencia de transferencia horizontal de genes o HGT entre micobacterias de los mismos complejos e incluso entre otras especies que comparten nicho ecológico como *Pseudomonas aeruginosa* o *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística [36,57,58].

En este sentido, la publicación de Sapriel y col. de 2016 "*Genome-wide mosaicism within Mycobacterium abscessus: evolutionary and epidemiological implications*", hace referencia a la alta importancia que ha tenido la HGT en la evolución de este patógeno. Explica como gracias a la secuenciación masiva se ha podido observar que la mayor parte de los genomas de las subespecies correspondientes a este complejo tienen trazas de las otras subespecies. De hecho, explica cómo algunas cepas en concreto no se pueden considerar de una subespecie

determinada sinó que tienen mezcla de varias subespecies en su genoma a las que denomina “*admixture*”. En este sentido existen publicaciones que avalan la utilización de más de un gen para clasificar las cepas del complejo *M. abscessus* en sus respectivas subespecies [24,43,58,59].

Además, existe cierta controversia en la literatura sobre qué genes se deben de utilizar para la correcta identificación del complejo *M. abscessus*. El único punto en el que la gran mayoría de autores está de acuerdo es en la necesidad de amplificar y secuenciar más de un gen constitutivo para asegurar la correcta identificación de la subespecie. El análisis de secuencias *multiloci* (MLSA de sus siglas en inglés *MultiLocus Sequence Analysis*) se basa en la comparación de las secuencias nucleotídicas de varios genes estructurales.

La correcta forma de identificar hasta el nivel de subespecie es por consenso de mayor porcentaje de idéntidad entre más de 3 genes constitutivos secuenciados [42,60].

Los genes constitutivos mayormente utilizados para la correcta identificación de *M. abscessus* son:

1. El gen *rpoB*: gen correspondiente a la subunidad beta de la ARN polimerasa.
2. El gen *secA*: gen correspondiente a la subunidad de la preproteína translocasa A.
3. El gen *hsp65*: gen correspondiente a la proteína de 65 kDa de choque térmico (“*heat shock protein*”).
4. El gen *sodA*: gen correspondiente a la superóxido dismutasa.
5. El gen *recA*: gen correspondiente a la proteína RecA.

#### **1.2.3.4. Secuenciación completa del genoma (WGS)**

La secuenciación completa del genoma o WGS (de sus siglas en inglés *Whole Genome Sequencing*), es el proceso de determinar la secuencia de ADN completa de un organismo en una sola vez. Desde 1995, cuando se estudió por primera vez el genoma entero de *Haemophilus influenzae*, se han ido secuenciando cada vez más organismos [61]. Actualmente la metodología ha mejorado de forma notable y se ha rebajado el coste de cada secuenciación con lo que esta técnica es más utilizada.

La primera secuencia completa del genoma de *Mycobacterium abscessus* fue publicada en 2009 en el artículo de Ripoll y col. "Non mycobacterial virulence genes in the Genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*" [36].

Desde esta publicación de Ripoll y col. en 2009 se han publicado 1713 informes de ensamblaje y anotación de *M. abscessus*. La WGS ha confirmado la distribución del complejo *M. abscessus* en 3 subespecies [24,29]. Además, ha permitido describir la transferencia horizontal de genes entre las 3 subespecies y la correcta identificación de cepas "admixture" [58,62,63]. Aunque la aportación quizás más significativa de la secuenciación masiva en lo referente al estudio de *M. abscessus*, ha sido en la epidemiología. La sugerencia de Bryant y col. en 2016 de existencia de clones predominantes a nivel global y la posible transmisión directa de paciente a paciente ha cambiado la percepción de *M. abscessus*. Pasaría de adquirirse del medio ambiente a tener capacidad de

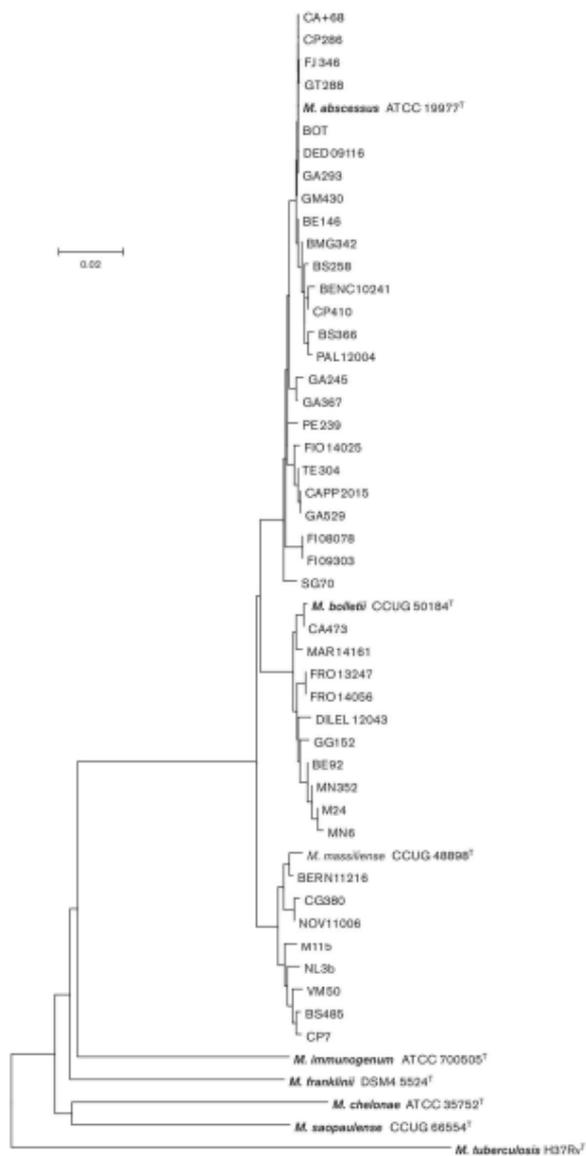
transmisión de paciente a paciente en centros de fibrosis quística [32].

La WGS permite estudiar todo el genoma de un organismo con una profundidad que es imposible de alcanzar con la metodología tradicional de la secuenciación de Sanger. El método de la WGS se basa en romper el genoma de un organismo en fragmentos de tamaños conocidos y seleccionarlos (de 250 a 1500 pb). Después se crea lo que se conoce como librería genómica en la que esos fragmentos seleccionados son amplificados por PCR y marcados en los extremos con secuencias conocidas de nucleótidos llamados adaptadores. Después se secuencian y se obtienen los datos de secuenciación que necesitan ser procesados por ordenador. El procesamiento de los datos por ordenador se encarga de analizar los fragmentos secuenciados e intentar ensamblarlos en un genoma. Esto permite la comparación de la información genética de los organismos secuenciados y el análisis filogenético. Para la identificación de las subespecies en el complejo *M. abscessus* se puede buscar la máxima identidad del genoma con un genoma de referencia de cada subespecie [64] o crear un árbol filogenético incluyendo genomas conocidos y representativos de las 3 subespecies [24]. La distribución que se observa en este último caso permite observar como los miembros de la misma subespecie se agrupan en las mismas ramas del árbol y claramente se diferencian de las demás subespecies.

En la figura 4 se puede observar como el análisis de secuenciación masiva permite diferenciar el complejo *M.*

*abscessus* en 3 subespecies diferentes y además diferenciarlo claramente de organismos muy cercanos como *M. chelonae*, *M. immunogenum* o *M. franklinii*.

**Figura 4.** Árbol filogenético de *M. abscessus* y especies cercanas.



El árbol se ha creado por *Neighbour-Joining* inferido de la matriz de distancia de genoma a genoma. Imagen tomada de Tortoli y col. 2016 [24].

## 1.2.4. Patogenia

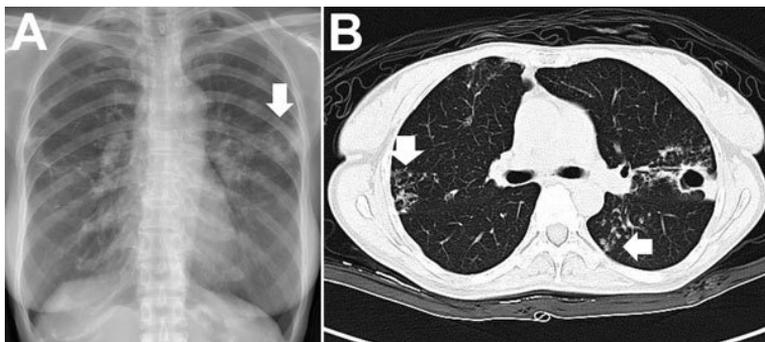
### 1.2.4.1. Infección del tracto respiratorio

*Mycobacterium abscessus* es un patógeno oportunista que puede causar infección pulmonar, especialmente en huéspedes vulnerables con enfermedades pulmonares estructurales subyacentes como pacientes con fibrosis quística, bronquiectasias o personas que hayan sufrido tuberculosis previamente [18]. Es la etiología más frecuente de infección respiratoria causada por RGM [65].

Aunque las 3 subespecies pueden causar infección, la mayor parte de las infecciones pulmonares crónicas causadas por *M. abscessus* corresponden a *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *massiliense*. La tomografía computerizada de alta resolución del tórax en estos pacientes suele mostrar bronquiectasias cilíndricas y nódulos afectando el lóbulo medio derecho y la língula. La enfermedad producida por la infección del complejo *M. abscessus* sigue un curso indolente, una disminución de la función pulmonar y deterioro de la calidad de vida [60].

La infección pulmonar crónica por *M. abscessus* afecta con especial relevancia a pacientes con fibrosis quística [18,45,60]. Los síntomas que pueden presentar varían entre pacientes, que van desde fiebre e incremento de hemoptisis hasta pacientes sin cambio en sus síntomas clínicos. En los pacientes en los que se plantea el trasplante de pulmón, la colonización del tracto respiratorio por *M. abscessus* todavía representa una contraindicación para el trasplante en muchos centros [32].

**Figura 5.** Radiografía y tomografía de la infección pulmonar causada por *M. abscessus*.



A) Radiografía torácica y B) tomografía computarizada de alta resolución de un paciente con infección pulmonar causada por *M. abscessus* subsp. *abscessus*. En la imagen A) la flecha indica la cavidad en el pulmón izquierdo. En la imagen B) la flecha horizontal indica los nódulos y la flecha vertical las bronquiectasias. Imagen tomada de Lee y col. 2015 [18].

#### **1.2.4.2. Infección de piel y tejidos blandos**

El complejo *M. abscessus* causa infección de piel y mucosas. Estas infecciones pueden ir desde infecciones localizadas, hasta infecciones profundas en los tejidos, o infecciones diseminadas.

Generalmente, *M. abscessus* atraviesa la barrera cutánea por inoculación. Los tratamientos por mesoterapia, los tatuajes y la

cirugía plástica o remodeladora han sido asociados cómo los causantes de las infecciones de piel y tejidos blandos por *M. abscessus* [18,41]. Los pacientes suelen estar sanos aunque la inmunosupresión farmacológica aumenta levemente el riesgo de este tipo de infecciones. El esquema clínico de las infecciones en heridas post-traumáticas causadas por *M. abscessus* oscila entre una celulitis o absceso hasta una osteomielitis [45,60]. Por otra parte, los pacientes con infecciones cutáneas causadas por *M. abscessus* pueden sufrir infecciones diseminadas con la aparición de diferentes nódulos eritomatosos o abscesos que causan picor y dolor en zonas como los brazos, las piernas y los glúteos.

**Figura 6.** Lesiones cutáneas producidas por *M. abscessus* subsp.*abscessus*.



Lesiones en el muslo derecho (a y c) y adenopatía inguinal (a y b). Imagen extraída y adaptada de Costa-Silva y col. 2018 [66].

**Figura 7.** Lesiones cutáneas producidas por *M. abscessus* subsp. *abscessus*.



A) Erupciones eritematosas difusas en la cara y linfadenitis cervical bilateral en un hombre de mediana edad. B) Nódulo subcutáneo circunscrito con secreción de pus en el brazo derecho de un niño de 12 años. C) Infección de la herida en ambos párpados superiores de una mujer de 36 años; La infección se desarrolló 1 semana después de la cirugía estética. Imágenes extraídas de Lee y col. 2015 [18].

### **1.2.4.3. Otras infecciones menos comunes causadas por *M. abscessus***

La infección del sistema nervioso central causada por el complejo *M. abscessus* es muy rara. Pero cuando ocurre, las manifestaciones más comunes son meningitis y abscesos cerebrales. Aunque rara, este tipo de infecciones tienen una alta morbilidad y mortalidad [45]. Esta infección se observa en pacientes sometidos a neurocirugía, pacientes con catéteres intracraneales, y pacientes con enfermedades otológicas [67]. La infección diseminada por los miembros del complejo *M. abscessus* está en aumento. La puerta de entrada más frecuente es el uso de catéter central [68,69]. Otra puerta de entrada es la infección de la herida quirúrgica, sobretodo en *M. abscessus* subsp. *massiliense* [70]. Las infecciones

diseminadas por *M. abscessus* tienden a darse en pacientes inmunocomprometidos.

La incidencia de queratitis, endoftalmitis, escleritis y, en definitiva, cualquier tejido relacionado con el área ocular causada por NTM, ha aumentado en la última década. Es difícil saber con exactitud qué porcentaje de las infecciones oculares corresponde únicamente a los miembros del complejo *M. abscessus* porque los estudios publicados con anterioridad al año 2015 sobre este tema no hacen distinción entre *M. chelonae* y *M. abscessus*.

### **1.2.5. Factores de virulencia**

La secuenciación completa del genoma de *M. abscessus* reveló no sólo la presencia de genes de virulencia propios de las micobacterias sino que también se observó la presencia de diferentes genes de patogenicidad de otros microorganismos, en especial los asociados a fibrosis quística [36].

Muchos factores implicados en la virulencia de *M. tuberculosis* tienen ortólogos en el genoma de *M. abscessus*. Los genes ortólogos son genes que derivan de un gen ancestral común: son genes homólogos que pueden tener diferencias en la secuencia nucleotídica pero las proteínas resultantes de su traducción tienen funciones parecidas.

Al contrario de lo que pasa con algunos genes de resistencia la mayoría de factores de virulencia están presentes en las 3 subespecies por igual.

#### **1.2.5.1. Factores de virulencia asociados a la supervivencia intracelular**

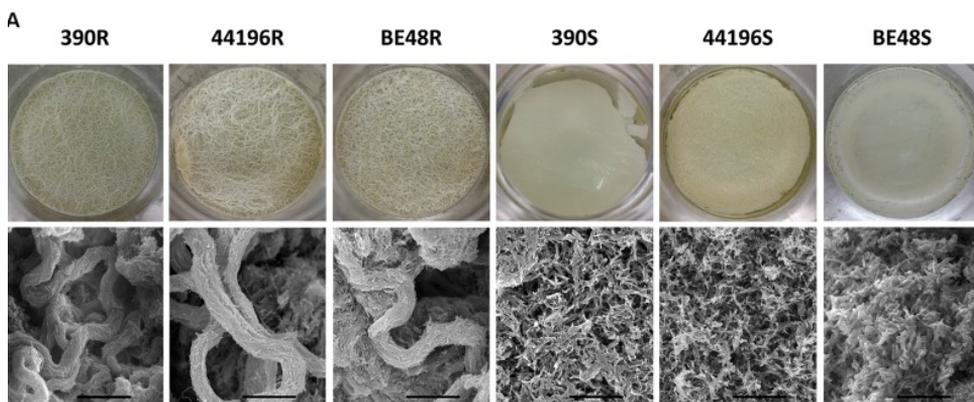
Se observan dos tipos de morfología de las colonias en el complejo *M. abscessus*: colonias lisas y colonias rugosas. En la figura 8 se pueden observar las diferencias.

La diferente morfología de las colonias está asociada a la presencia o ausencia de un glicopeptidolípido (GPL) de la superficie de la membrana [71-73]. Las variantes rugosas tienen deficiencia en la expresión de este GPL por la pérdida de función de alguno de los genes implicados en su síntesis o

transporte como el *mmpL4b*. La pérdida de este gen transforma una cepa lisa en rugosa [71]. Las cepas con morfología rugosa, tienen la capacidad de formar cordones, una característica típica de *M. tuberculosis*.

Ambos morfotipos son capaces de sobrevivir dentro de los macrófagos. Pero las cepas con morfotipo rugoso son capaces de agregarse dentro del fagosoma y a las 48h-72h destruirlo liberándose fuera de las células [73-75]. En cambio, las cepas con morfotipo liso no son capaces de replicarse dentro del fagosoma pero si son capaces de evitar la unión de éste al lisosoma y bloquear la maduración del fagosoma [76].

**Figura 8.** Cepas de *M. abscessus* rugosas y lisas.

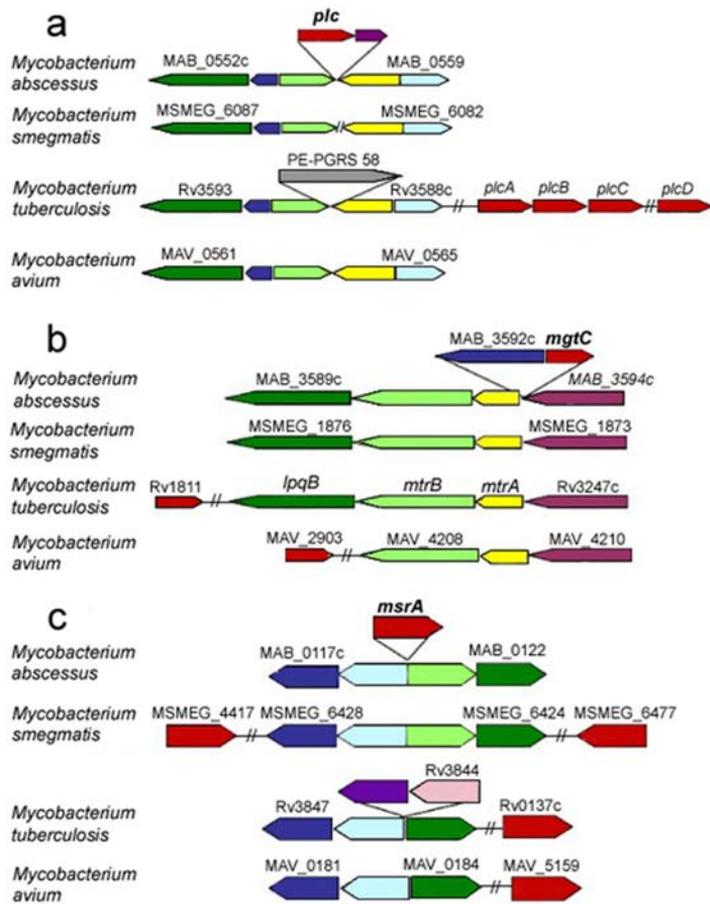


Películas y cordones microscópicos de *M. abscessus* formados en botellas de 1L con 100 ml de medio y su ultraestructura determinada por el microscopio electrónico de barrido (SEM). El tamaño de la barra es de 15 nm. Imagen tomada de Llorens-Fons y col. 2017 [73].

\* Las 3 primeras muestras corresponden a colonias del tipo rugoso (R, *Rough*) y las 3 siguientes a colonias del tipo liso (S, *Smooth*). En la imagen del SEM se observa la formación de los cordones en las colonias R.

La capacidad de formación de cordones está directamente relacionada con la virulencia en *M. tuberculosis*. En *M. abscessus*, la capacidad de formación de cordones le permite crecer dentro del fagosoma y escapar de éste y de los macrófagos. Los factores de virulencia asociados a la morfología rugosa y la capacidad de formar cordones en *M. abscessus* son: la deficiencia en la síntesis y el transporte del glucopeptidolípido de la superficie o del lipooligosacárido [74]. Por otra parte, *M. abscessus* contiene un repertorio de genes asociados a la supervivencia intracelular propios de micobacterias (algunos ejemplos: *mgtC*, *msrA*, *plc*, etc.) [36], pero también de otros microorganismos. Algunos de estos genes están relacionados con la capacidad de escapar del fagosoma por la disrupción de la membrana eucariota y la captación de iones metálicos como el magnesio y el hierro para mejorar la supervivencia intracelular [36].

**Figura 9.** Ejemplos de genes del genoma de *M. abscessus* comparados con los genes de otras micobacterias. Imagen tomada de Ripoll y col. 2009 [36].



### **1.2.5.2. Factores de virulencia asociados a la infección respiratoria en pacientes con fibrosis quística**

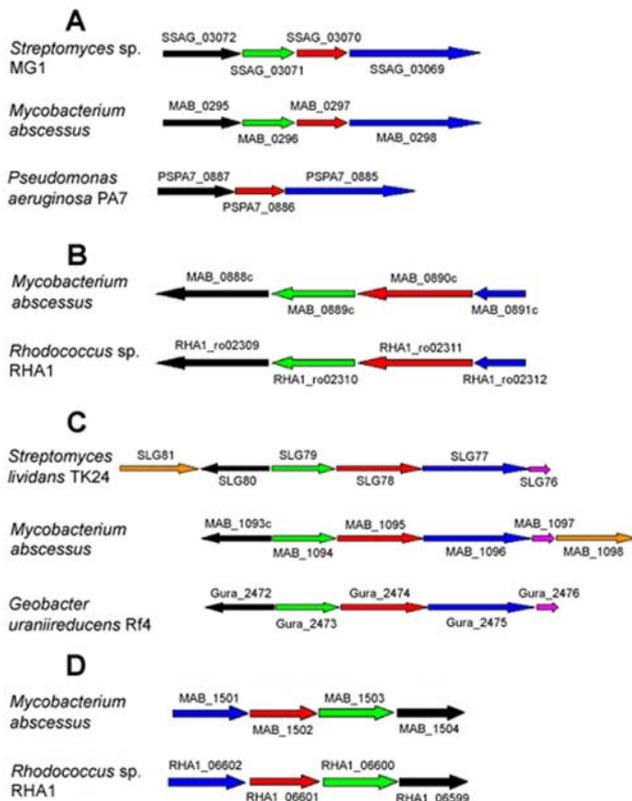
Algunos factores de virulencia encontrados en *M. abscessus* son propios de bacterias que causan infección en pacientes con FQ. Estos factores de virulencia están relacionados con la adaptación de estas bacterias a la infección respiratoria en dichos pacientes. Por ejemplo, se han encontrado factores relacionados con la capacidad de *Pseudomonas sp.* a persistir en los pacientes con fibrosis quística. También factores de *Pseudomonas aeruginosa* que le dan la capacidad de adaptarse al tracto respiratorio de los paientes con fibrosis quística y factores de virulencia propios de *Burkholdelia cepacia* asociados a la capacidad de ésta de sobrevivir en la infección pulmonar crónica. Se han encontrado factores propios de *Streptomyces lividans* asociados a la degradación de ADN. El esputo de los pacientes con fibrosis quística es extremadamente rico en ADN y la presencia de genes capaces de degradarlo puede constituir una fuente de nutrientes para los organismos que tengan estos factores de virulencia [36].

El genoma de *M. abscessus* contiene genes asociados a factores de virulencia propios de bacterias con las que comparte nicho ecológico. La idea general es que los genes de virulencia no propios de micobacterias presentes en el genoma de *M. abscessus* han sido adquiridos por transferencia horizontal. La plasticidad del genoma de *M. abscessus* y su capacidad para incorporar genes de otras especies o entre sus

propias subespecies creando algunas poblaciones denominadas “quiméricas” muestra la gran capacidad de adaptación de este patógeno. Estas poblaciones quiméricas parecen tener unas capacidades más elevadas para colonizar los pulmones de los pacientes con fibrosis quística. Aunque tampoco se puede descartar que la colonización de los pulmones de estos pacientes favorezca el intercambio génico en este nicho ecológico tan específico [58].

Aunque *M. abscessus* posee una gran cantidad de genes de virulencia propios de micobacterias o de otros organismos, una comparación de genes de virulencia del genoma presentes en *M. abscessus* y *M. tuberculosis* demuestra que *M. abscessus* tiene déficit de algunos de estos genes. No están presentes genes relacionados con el metabolismo de ácidos micólicos que sí están en *M. tuberculosis*. Así como la ausencia de algunos genes relacionados con el sistema de excreción ESX de las micobacterias y la ausencia del gen *mmpL8* que demuestra que *M. abscessus* es menos patógeno que *M. tuberculosis* [77].

**Figura 10.** Ejemplos de algunos genes encontrados en el genoma de *M. abscessus* con homólogos en otras bacterias no micobacterias. Imagen adaptada de Ripoll y col. 2009 [36].



## 1.2.6. Tratamiento

*M. abscessus* es reconocido como una de las RGM más resistentes a los antibióticos. *M. abscessus* tiene una resistencia natural a un gran número de antibióticos, por la presencia de enzimas como betalactamasas o enzimas modificadoras de aminoglicósidos, y por la presencia de una pared celular muy poco permeable [78-80].

El tratamiento de las infecciones causadas por *M. abscessus* depende en gran medida de la susceptibilidad de la cepa que causa la infección. Para conocer la susceptibilidad de la cepa es necesario realizar un test de susceptibilidad antibiótica. Los resultados de los test de susceptibilidad permiten guiar el tratamiento y evitar, cuando es posible, la administración de antibióticos a los cuáles *M. abscessus* presenta resistencia [81]. El método estándar para el estudio de la sensibilidad es la microdilución en placa con CAMHB (*Cation-Adjusted Muller-Hinton Broth*, caldo de cultivo Muller-Hinton ajustado de cationes). Es el método más reproducible y comparable entre laboratorios. Otros métodos como el E-test también han sido utilizados pero carecen de la misma reproducibilidad y la recomendación de las guías oficiales es la utilización de la microdilución. Los antibióticos que se deben analizar cuando se realiza el test de susceptibilidad antibiótica en *M. abscessus* son: claritromicina (macrólido), cefoxitina (betalactámico), ampicilina (aminoglucósido), tigeciclina (glicilciclina), imipenem (carbapenémico), minociclina (tetraciclina), doxiciclina (tetraciclina), moxifloxacino (fluoroquinolona), linezolid (oxazolidona) y trimetoprim-sulfametoxazol (inhibidor de la dihidrofolato reductasa en combinación con una sulfonamida) [78,81,82].

## **1.2.6.1. Macrólidos**

### **1.2.6.1.1. Estructura química**

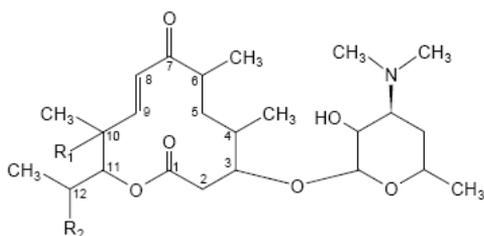
Los macrólidos son un grupo de compuestos orgánicos naturales que consisten en un anillo macrocíclico de lactona unido a uno o varios deoxi-azúcares. Algunos de estos compuestos tienen actividad antimicrobiana y son usados como antibióticos (eritromicina, azitromicina o claritromicina, entre otros).

Los anillos de lactona de los macrólidos con actividad antibiótica pueden estar compuestos por 14-, 15-, o 16-átomos. El anillo de los primeros macrólidos como la eritromicina, está compuesto por 14 átomos de carbono. El incremento de los átomos de carbono y algunas modificaciones estructurales hace que se mejore la actividad de estos compuestos frente a patógenos resistentes o se mejoren las propiedades farmacocinéticas. Por ejemplo, la azitromicina es un derivado de la eritromicina pero con un anillo de 15 carbonos que hace incrementar su estabilidad y su actividad frente a *Haemophilus influenzae*. La claritromicina también es un derivado de la eritromicina que conserva el anillo de 14 carbonos y cambia un radical que incrementa la estabilidad de este compuesto en medio ácido, haciendo que cuando se administra por vía oral no se degrade tanto el fármaco en el estómago. Además, la modificación de la claritromicina hace que se reduzcan los efectos secundarios adversos en el tracto gastrointestinal. Los macrólidos con anillos de 16 carbonos también se modifican químicamente para mejorar su espectro

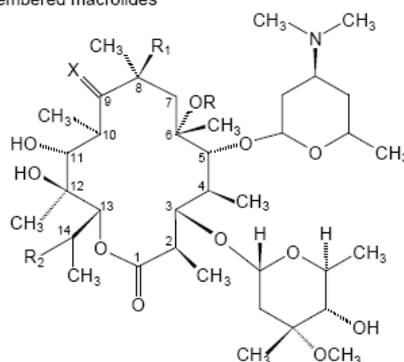
de acción y sus propiedades farmacocinéticas. También tienden a ser más efectivos frente a algunos mecanismos de resistencia de algunas bacterias que los macrólidos de 14 y 15 átomos. Un ejemplo es que la metiltransferasa codificada por el gen *ermTR* y la bomba de eflujo *mefA* de *Streptococcus pyogenes* lo hacen resistente frente a los macrólidos de 14 y 15 átomos pero no contra los de 16 [83].

**Figura 11.** Estructura química de los macrólidos. Imagen tomada de Zhanel y col. 2011 [83].

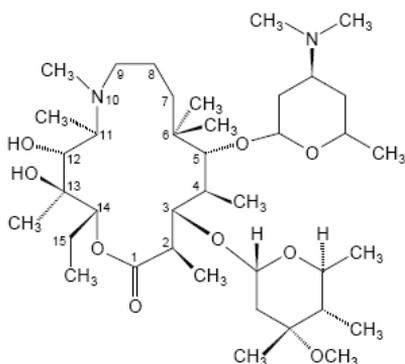
12-membered macrolides



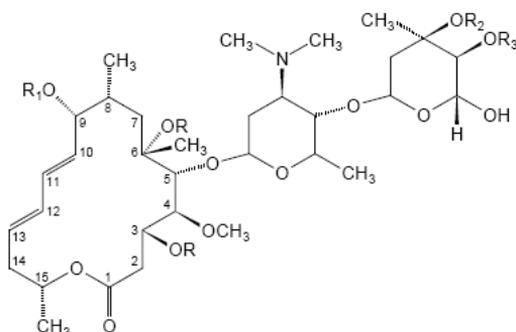
14-membered macrolides



15-membered macrolides



16-membered macrolides



### **1.2.6.1.2. Mecanismo de acción**

El macrólido entra en la célula y se une de forma irreversible al lugar dónde se situa el ARN de transferencia dentro del ribosoma y al propio ARN de transferencia, inhibiendo la translocación. Esta acción ocurre dentro de la unidad 50S del ribosoma en el ARN ribosomal 23S. En concreto, el macrólido se une a la adenina en posición 2058 del ARN ribosomal y al ARN de transferencia que entra en el ribosoma. Esta doble unión no permite que se unan más ARN de transferencia inhibiendo la síntesis de proteínas.

### **1.2.6.1.3. Mecanismos de Resistencia**

#### **I. Resistencia constitutiva**

La resistencia constitutiva a los macrólidos en *M. abscessus* es la resistencia que se da cuando se seleccionan mutaciones que dan lugar a alteraciones en la diana. La resistencia constitutiva se adquiere cuando se seleccionan mutaciones en las posiciones 2058 y/o 2059 del ARN ribosómico 23S codificado por el gen *rrl*. El cambio de una adenina (A) por cualquier otra base (G, guanina; C, citosina; T, timina) hace que el macrólido no se pueda unir a la posición 2058 inhibiendo su acción antimicrobiana [84].

Detectar un cambio nucleotídico en cualquiera de las dos posiciones se puede efectuar por la amplificación y posterior secuenciación del gen *rrl*. De forma fenotípica es posible intuirlo puesto que cuando se mide la CMI en la prueba de sensibilidad antibiótica se observan CMIs muy elevadas a los pocos días (entre los 3 y 5 primeros días).

## II. Resistencia inducible

Una de las características más importantes del complejo *M. abscessus* es la presencia del gen *erm(41)* que codifica para una metiltransferasa capaz de transferir un grupo metilo a la posición 2058 del RN ribosómico 23S [85]. Esta metilación impide la unión de los macrólidos a esta región del ribosoma e impide su acción antibiótica. La característica principal de esta resistencia es que es un mecanismo inducible. Esto quiere decir que sólo se produce la proteína en presencia de un inductor, en este caso la presencia de un macrólido.

Esta proteína sólo es funcional si está completa, no tiene deleciones, y si tiene una timina en la posición 28 (polimorfismo 28T). La regulación inducible de la proteína del gen *erm(41)* hace que su actividad tarde en reflejarse en el antibiograma convencional de lectura a las 72 horas. En el caso del complejo *M. abscessus*, el CLSI recomienda extender el periodo de incubación del antibiograma hasta los 14 días para los macrólidos, claritromicina y azitromicina entre otros [82].

En *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* el gen *erm(41)* está incompleto y tiene 2 deleciones. Una primera deleción de dos nucleótidos en las posiciones 64 y 65 y una segunda deleción de 264 pares de bases a partir de la posición 274 [86]. De forma que no produce una proteína funcional. En *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* existen hasta 10 variedades diferentes. De entre esas 10 variedades las que poseen el polimorfismo 28T son las que tienen un gen funcional, que se traducirá en la metiltransferasa y dará

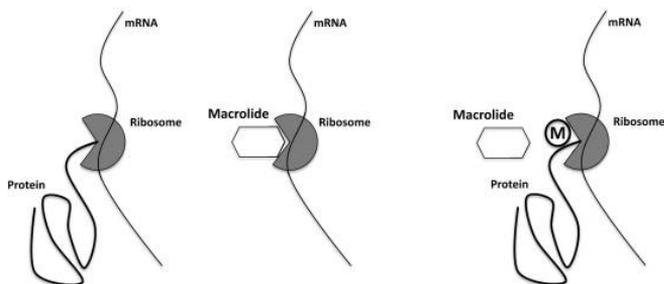
resistencia [87]. En *M. abscessus* subsp. *bolletii*, todas las cepas presentan un gen *erm(41)* funcional.

Actualmente lo recomendable es no tratar nunca con monoterapia e incubar las placas de microdilución 14 días para detectar la resistencia inducible. Alternativamente, para disponer de los resultados más rápidamente, se puede secuenciar el gen *erm(41)*.

En la figura 12 se puede apreciar el mecanismo de resistencia del producto del gen *erm(41)* funcional. En la figura 12 A) se observa el funcionamiento de un ribosoma sin la presencia del macrólido; la inhibición de la traducción a proteína que causa la acción del macrólido al unirse al ribosoma; y finalmente, la inducción del producto del gen *erm(41)* funcional en presencia de macrólidos inhibiendo la acción de estos antibióticos. También se observa en la imagen 12 B) la secuencia aminoacídica del ARN ribosomal 23S y se destacan las 2 bases de adenina donde se seleccionan las mutaciones.

**Figura 12.** Estructura del ARN ribosomal 23S dónde se unen los macrólidos.

**A.**



**B.**



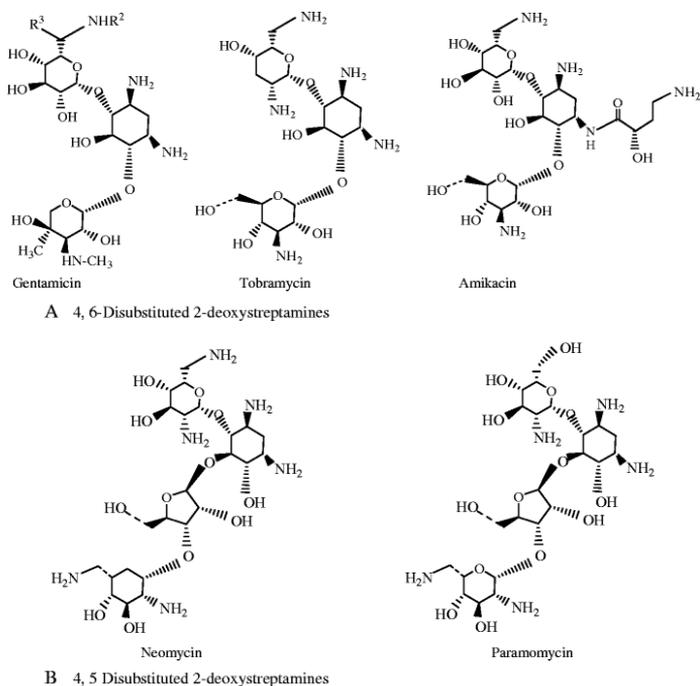
A) Esquema de la acción inhibitoria del antibiótico por el producto del gen *erm(41)* en el ribosoma y la acción de inducción del macrólido. Imagen tomada de Stout y Floto 2012 [88]. B) El círculo rojo indica las dos posiciones donde se pueden seleccionar mutaciones (2058-2059). Imagen adaptada de Meier y *col.* 1994 [89].

## **1.2.6.2. Aminoglucósidos**

### **1.2.6.2.1. Estructura química**

Los aminoglucósidos son una familia de moléculas que contienen en su núcleo un anillo de aminociclitol que puede ser de estreptidina o 2-deoxiestreptamina. A este núcleo se le unen mediante puentes glicosídicos dos o más azúcares. El primer aminoglucósido descubierto fue la estreptomina en 1944. Algunos aminoglucósidos son sustancias naturales producidas por actinomicetos del género *Streptomyces* o *Micromonospora*. Algunos otros aminoglucósidos son de origen semisintético, normalmente son derivados modificados de los naturales. La estreptomina y la kanamicina A son naturales, mientras que la amicacina y la tobramicina son semisintéticos [90].

**Figura 13.** Estructura química de los aminoglucósidos y ejemplos. Imagen tomada de Jana y Deb 2006 [90].



### 1.2.6.2.2. Mecanismo de acción

La actividad bactericida de los aminoglucósidos se debe a la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas. La molécula de aminoglucósido se une al ARN ribosomal 16S situado dentro de la subunidad 30S del ribosoma. La unión de la molécula antibiótica y el ribosoma perturba la elongación de la cadena de proteína que se está formando e inhiben la correcta síntesis proteica. Inhibe la capacidad de los ribosomas de discriminar correctamente los ARN de transferencia. Esto implica que se produzcan proteínas aberrantes [91]. Las proteínas aberrantes pueden ser insertadas en la membrana de las bacterias

alterando la permeabilidad y abriendo huecos por donde se desestabiliza la célula y muere.

#### **1.2.6.2.3. Mecanismos de resistencia por mutaciones en la diana (16S)**

El principal mecanismo de resistencia en las micobacterias frente a los aminoglucósidos es el relacionado con la modificación de la diana. Mutaciones en el gen *rrs*, que codifica la región 16S del ARN ribosomal, inhiben la acción de los aminoglucósidos. El cambio de una adenina por una guanina en la posición 1408 (A1408G) da resistencia a la amicacina y a todos los aminoglucósidos con el anillo de 2-deoxiestreptamina (e.g. kanamicina, gentamicina, tobramicina y neomicina) [92,93]. Mutaciones en este mismo gen pero en posiciones adyacentes al lugar de unión (C491T, T1406A, C1409T y G1491T) también dan lugar a resistencia [79,94].

#### **1.2.6.2.4. Mecanismos de resistencia por mutaciones cerca de la diana (Proteína ribosomal S12)**

La proteína S12 del ribosoma es un componente estructural de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y se encuentra adyacente al ARN ribosomal 16S. El mecanismo de acción de los aminoglucósidos se basa en su unión al ARN ribosomal 16S que como se muestra en la figura 14 se encuentra en contacto con la proteína S12. La proteína S12 está codificada por el gen *rpsL*. Las mutaciones en el gen *rpsL* que causan cambios aminoacídicos en la secuencia peptídica de la proteína S12 pueden hacer variar la conformación tridimensional de esta proteína y tapar la diana dónde actúan los aminoglucósidos

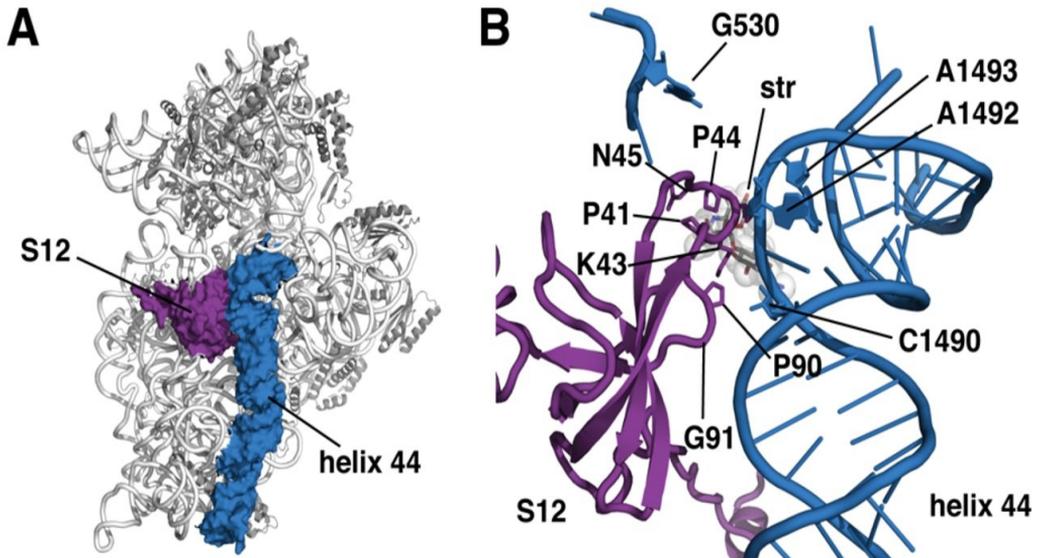
[94–98]. En *M. tuberculosis*, las mutaciones más comunes que causan resistencia a los aminoglucósidos en la proteína S12 son el cambio de una lisina (K) por una arginina (R) en el aminoácido 43 (K43R) y el cambio de K por R en el aminoácido 88. En *M. abscessus* se ha observado que estos dos cambios dan resistencia a los aminoglucósidos y además en la posición 43 el cambio de K por una asparagina (N) también da resistencia [94].

#### **1.2.6.2.5. Mecanismos de resistencia por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAG)**

La resistencia a aminoglucósidos en muchas bacterias es debida a la presencia de EMAG. Estas enzimas se unen a los aminoglucósidos que entran en el citoplasma de las células bacterianas y catalizan una reacción en la que unen una determinada molécula al antibiótico, inhibiendo la capacidad de este último de unirse al ribosoma y/o al ARN de transferencia. Según el tipo de molécula que unen al antibiótico estas enzimas se pueden clasificar en 3 clases:

1. N-acetiltransferasas (AAC): catalizan una acetilación, transfieren un grupo acetato del Acetil-CoA a un grupo amino del aminoglucósido.
2. O-fosfotransferasas (APH): catalizan una fosforilación, transfieren un grupo fosfato del ATP a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.
3. O-nucleotidiltransferasas (ANT): catalizan una nucleotidación, transfieren un nucleótido monofosfato de un nucleótido trifosfato a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.

**Figura 14.** Estructura de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (*T. thermophilus*).



A) Estructura de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. En morado, la proteína S12; en azul, el ARN ribosomal 16S (helix 44 e la hélice 44 del ARN ribosomal 16S). B) Vista de cerca del lugar donde se une el aminoglucósido. En morado, la proteína S12 con los aminoácidos mutados que dan lugar a la resistencia a la estreptomicina (P41, prolina en la posición 41; K43, lisina; P44, prolina; N45, asparagina; P90, prolina; G91, glicina); en azul, el ARN ribosomal 16S con los residuos nucleotídicos envueltos en el reconocimiento de los codones marcados (G530, guanina en la posición 530 de la cadena de ARN; A1490, alanina; A1492, alanina; A1493, alanina); en translúcido, str, molecula de estreptomicina. En la imagen la posición 1406 del ARN ribosomal se encontraría muy cerca de la posición K43 de la proteína S12. Imagen tomada de Demirci y col. 2013 [98].

Todas las micobacterias tienen genes que codifican para EMAG. En concreto, todas las micobacterias poseen genes que codifican para una 2'-N-acetiltransferasa que impide el efecto bactericida de los aminoglucósidos [99].

En 2009, cuando se secuenció por completo el genoma de *M. abscessus*, se identificó una 2'-N-acteiltransferasa y 12 homólogos de fosfotransferasas de aminoglucósidos [36].

Posteriormente, en 2013, se observó la posible función de acetiltransferasa del gen *MAB\_3168c* de *M. abscessus* que incrementa la MIC a amikacina [100]. El estudio de Maurer y col. demostró la capacidad de la AAC(2')-Id codificada por un gen cromosómico de *M. abscessus* para inhibir la tobramicina pero no la amikacina [101,102]. Por otro lado, el estudio de Rominski y col. de 2017 [103] también demostró la implicación del gen *eis2* en la resistencia a la amicacina de *M. abscessus*. El gen *eis2* de *M. abscessus* codifica para una acetiltransferasa que afecta a los aminoglucósidos (en especial la amicacina), que muestra homología con el gen *eis* de *M. tuberculosis* ampliamente estudiado [95,103]. Los estudios de Hurst-Hess y col. de 2017 también relacionan la regulación ejercida por el regulón *whib7* sobre el gen *eis2* con la alta resistencia a la amicacina en *M. abscessus* [104].

Por lo que respecta a *M. abscessus*, el mecanismo principal de la resistencia a los aminoglucósidos es la selección de mutaciones en las posiciones 1407, 1408, 1409 y 1491 del gen *rrs* del 16S del ARN ribosómico. Hay que tener en cuenta la presencia en su genoma de diferentes tipos de EMAG que explican la pérdida de función bactericida de estos antibióticos i las CMI's ligeramente elevadas.

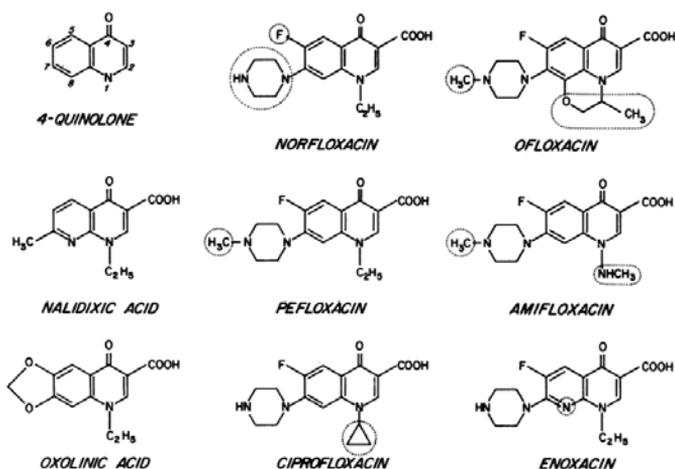
## 1.2.6.3. Fluoroquinolonas

### 1.2.6.3.1. Estructura química

El ácido nalidíxico, la primera quinolona, fue aislado en 1962 por Leshner y *col.* en 1962 [105] como un bioproducto de la síntesis de cloroquina. Las quinolonas fueron entonces introducidas en el ámbito clínico en la década de 1960. Las fluoroquinolonas son compuestos químicos sintéticos derivados de las quinolonas en las que se han realizado cambios en su estructura química y se ha introducido un átomo de fluor en la posición C6.

Las fluoroquinolonas son antibióticos de amplio espectro. Tienen una gran eficacia contra bacterias grampositivas tanto como gramnegativas y micobacterias no tuberculosas así como frente a tuberculosis [106].

**Figura 15.** Estructura química de las quinolonas y fluoroquinolonas.



El átomo de fluor y el anillo radical están indicados con círculos en la norfloxacin, los cambios que difieren de la norfloxacin también están indicados con círculos en las demás fluoroquinolonas. Imagen extraída de Wolfson y Hooper 1985 [107].

### **1.2.6.3.2. Mecanismo de acción**

Estos compuestos químicos sintéticos afectan a enzimas esenciales de las células bacterianas. Afectan tanto a la ADN girasa como a la topoisomerasa IV. Ambas enzimas, están formados por dos unidades alfa y dos betas. Se encargan de relajar el ADN de las células cortándolo e introduciendo torsión negativa y deshaciendo el superenrollamiento, un proceso esencial en la célula. Brevemente, el ADN de todas las células existe como una cadena de doble hélice que se retuerce sobre sí misma y se cruza sobre ella para producir un empaquetado que la célula pueda contener. En las bacterias el ADN se puede torcer aún más en un proceso llamado superenrollamiento. Éste puede ser positivo (compactación del ADN) o negativo (relajación del ADN). En las bacterias la ADN girasa y la topoisomerasa IV introducen lazos de superenrollamiento negativo, relajando la torsión del ADN y dejándolo laxo. Aunque la ADN girasa y la topoisomerasa IV tienen una función homóloga existen diferencias significativas entre ellas. La ADN girasa es capaz de introducir lazos de superenrollamiento negativo en ADN ya relajado, mientras que la topoisomerasa IV sólo es capaz de introducir esos lazos si el ADN está en superenrollamiento positivo. El cuidadoso mantenimiento del superenrollamiento del ADN de la célula es esencial en los procesos genéticos clave que permiten controlar la expresión génica y por tanto, determinan el fenotipo de la célula. Tal es la importancia del superenrollamiento del ADN de la célula que pequeños cambios en los grados de superenrollamiento

pueden alterar la expresión de múltiples genes incluyendo aquellos involucrados en la patogénesis y la respuesta al estrés.

Las fluoroquinolonas afectan a ambas enzimas, dependiendo de la fluoroquinolona y la especie de la bacteria, tienen más tendencia a afectar a una u otra como primera diana.

En *M. abscessus* sólo se ha descrito la ADN girasa. Ésta se une de forma covalente formando un complejo con el ADN. La ADN girasa está formada por dos subunidades alfa (codificadas por el gen *gyrA*) y dos subunidades beta (codificadas por el gen *gyrB*). Las quinolonas se unen de forma no covalente a la hélice 4 de la subunidad alfa de la ADN girasa impidiendo que una los segmentos rotos del ADN bacteriano. Como los enlaces de cada hebra están escalonados, se requieren dos moléculas de fármaco para aumentar los niveles de ruptura del ADN. La generación de estas brechas en el ADN desencadena la respuesta SOS de la célula y otras rutas de reparación del ADN. Si las brechas en las hebras de ADN sobrepasan los esfuerzos de los mecanismos para arreglarlas conlleva la muerte celular. Aunque de forma natural las micobacterias son menos sensibles a las fluoroquinolonas que otras bacterias, ya que solo se ha descrito la ADN girasa como única topoisomerasa de tipo II [106,108-110].

#### **1.2.6.3.3. Mecanismo de resistencia por modificación de la diana**

En *M. abscessus* la resistencia a las quinolonas se ha descrito como la selección de mutaciones que producen un cambio

aminoacídico en los genes *gyrA* y *gyrB* [79]. La región donde se concentran las mutaciones en estos genes se denominan regiones determinantes de la resistencia a quinolonas o QRDR (del inglés Quinolone Resistant Determining Region). Los cambios aminoacídicos en estas regiones alteran la estructura proteica de la diana de las quinolonas reduciendo o negando su afinidad por la ADN girasa. En *M. abscessus* el QRDR de la subunidad alfa (*gyrA*) se extiende de los residuos aminoacídicos 77 hasta el 106 (numeración de *E. coli*). El QRDR de la subunidad beta (*gyrB*) se extiende del residuo 436 al 464 (numeración de *E. coli*). Las resistencias descritas en *M. abscessus* se resumen en el cambio de alanina por valina en el residuo 90 (83 en la numeración de *E. coli*) en la subunidad alfa y los cambios en los residuos 516 de arginina por lisina y 533 de asparagina por serina (436 y 464 en numeración de *E. coli*) [108,111].

La baja sensibilidad a las quinolonas de *M. abscessus* se debe en parte a que de forma natural posee una alanina en la posición 90 de la subunidad alfa de la ADN girasa. En bacterias sensibles (e.g. *E. coli*) a las quinolonas esta posición suele ocuparla una serina. Pero esta sustitución natural de *M. abscessus* (y otras micobacterias), no constituye por si sola una explicación a la gran resistencia de algunas cepas a las quinolonas [108,111]. La hipótesis más aceptada sería que existen otros mecanismos aún no conocidos en esas cepas que explican las resistencias de alto nivel. O quizás la suma de diferentes mecanismos de baja resistencia en esas cepas da lugar a resistencias elevadas.

#### **1.2.6.3.4. Otros mecanismos de resistencia: permeabilidad de la membrana y bombas de eflujo**

La imposibilidad de entrada de los compuestos químicos dentro de la célula o la rápida expulsión de estos una vez dentro son de especial relevancia. El complejo *M. abscessus* tienen una pared celular y una membrana poco permeables. La pared cerosa impermeable de *M. abscessus* actúa como barrera física de entrada de los antibióticos y el genoma de *M. abscessus* contiene transportadores que pueden actuar como bombas de eflujo, transportadores del tipo ABC y proteínas de la familia MmpI5 [36,79].

## **1.2.6.4. Tetraciclinas y glicilciclinas**

### **1.2.6.4.1. Estructura química**

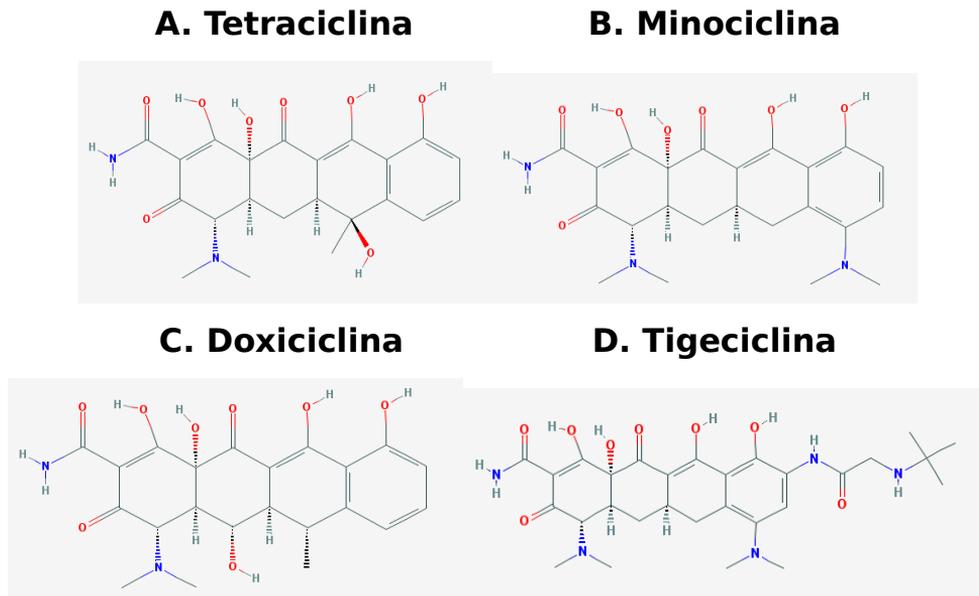
Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro que se utilizan desde el descubrimiento de la tetraciclina en 1948 [112]. Las tetraciclinas afectan a la síntesis proteica inhibiendo la entrada de ARN de transferencia en el ribosoma. Se unen a la subunidad 30S del ribosoma. Las tetraciclinas usadas para tratar las infecciones por *M. abscessus* son las tetraciclinas semisintéticas doxiciclina y minociclina [112,113].

Las glicilciclinas, descubiertas en 1993, son compuestos químicos análogos de las tetraciclinas. La tigeciclina es el primer antibiótico perteneciente a esta nueva familia de antibióticos. Fue diseñada para solventar los mecanismos de resistencia que tienen las bacterias contra las tetraciclinas: bombas de eflujo y mecanismos de protección del ribosoma. La tigeciclina es un análogo de la minociclina que actúa inhibiendo la transcripción proteica de la célula. Es un antibiótico bacteriostático, aunque a veces bactericida, se ha visto “*in vitro*” que tiene actividad contra bacterias grampositivas y gramnegativas, así como frente a RGM [114,115].

La estructura química de las glicilciclinas es muy similar a la estructura de las tetraciclinas. Ambos compuestos contienen un esqueleto químico carbocíclico de cuatro anillos. La diferencia entre la tigeciclina y la minociclina es el residuo unido al carbono 9 del anillo D en la primera, lo cual le confiere una afinidad cinco veces más potente que la de las

tetraciclinas a la unión del antibiótico a su diana y protección frente a las bombas de eflujo.

**Figura 16.** Estructura química de la tetraciclina, doxiciclina, minociclina y tigeciclina. Imágenes obtenidas de PubChem (disponible en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).



#### 1.2.6.4.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las gliciliclinas es el mismo que el de las tetraciclinas. El antibiótico se une de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. La unión del fármaco con el ribosoma bacteriano bloquea la entrada del ARN de transferencia al ribosoma. El bloqueo del ARN de transferencia evita la elongación de las proteínas que se están sintetizando porque no pueden entrar más aminoácidos en la cadena peptídica.

### 1.2.6.4.3. Resistencia

La resistencia a las tetraciclinas se debe principalmente a dos mecanismos: expresión de proteínas que protegen el ribosoma disociando la unión entre la tetraciclina y el ribosoma; y expresión de genes que codifican para bombas de eflujo activas que expulsan las tetraciclinas [115]. Otra forma de resistencia que tienen algunas bacterias es debido a enzimas modificadoras de las tetraciclinas.

En el complejo *M. abscessus*, la tigeciclina es muy eficaz a pesar de la gran resistencia que *M. abscessus* tiene frente a los antibióticos [114]. Respecto a las tetraciclinas doxiciclina y minociclina, *M. abscessus* es intrínsecamente resistente a ambas [116]. El estudio reciente de Rudra y col. de 2018 [112] demostró la inactivación de la minociclina y la doxiciclina por la proteína producida por el gen *MabTetX* (anteriormente *Mab\_1496c*) que codifica una monooxigenasa. La inactivación de las tetraciclinas con este tipo de enzimas es un mecanismo infrecuente de resistencia. Este mecanismo de resistencia se ha observado en otras bacterias como *Bacteroides* y recientemente se ha descrito en aislamientos clínicos de *Pseudomonas* y *Escherichia*. En *M. abscessus* la doxiciclina y la tetraciclina inducen la producción de *MabTetX* al unirse a su represor MabTetR (codificado por *Mab\_1497c*) que se encuentra codificado corriente arriba de *MabTetX* en la cadena de ADN. El mecanismo de resistencia se basa en la presencia de un represor (MabTetR) que no permite la síntesis de la monooxigenasa (producto de *MabTetX*) hasta que se une una

tetraciclina a este represor. En cuanto se une la tetraciclina al represor (MabTetR) éste pierde afinidad por el ADN y entonces se empieza a expresar *MabTetX* [112].

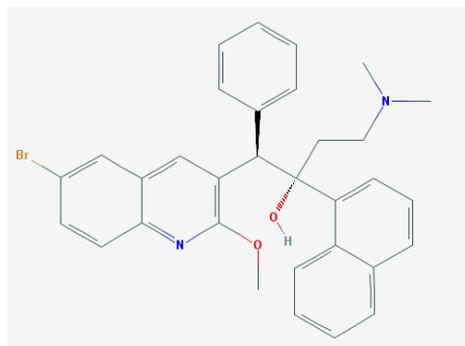
Por otro lado, la tigeciclina no se une a MabTetR y por tanto no induce la expresión de *MabTetX*. La resistencia a la tigeciclina en el complejo *M. abscessus* se debería dar por la selección de mutaciones en MabTetR que permitieran unirse la tigeciclina y además mutaciones en *MabTetX* que hicieran la enzima más afin a la tigeciclina [112].

## 1.2.6.5. Diarilquinolinas (bedaquilina)

### 1.2.6.5.1. Estructura química

Las Diarilquinolinas son un nuevo tipo de fármacos aprobados por la FDA en el 2012 para el tratamiento de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente [117]. Son compuestos químicos estrechamente relacionados con la quinolonas.

**Figura 17.** Estructura química de la bedaquilina. Imágene obtenida de PubChem (disponible en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).



### 1.2.6.5.2. Mecanismo de acción

Las diarilquinolinas no actúan contra la ADN girasa sino que inhiben específicamente la ATP sintasa de las micobacterias atacando a los bacilos activos metabólicamente y a los que están en fase latente. La bedaquilina (anteriormente TMC-207) es el único representante de esta nueva familia de antituberculosos. Ha resultado tener una buena actividad frente a tuberculosis sensible y multiresistente. En el caso de

*M. abscessus* existen informes que muestran buena actividad de la bedaquilina [118-120]; mientras que otros informes no son tan favorables con respecto a la actividad de la bedaquilina [121].

### **1.2.6.5.3. Resistencia**

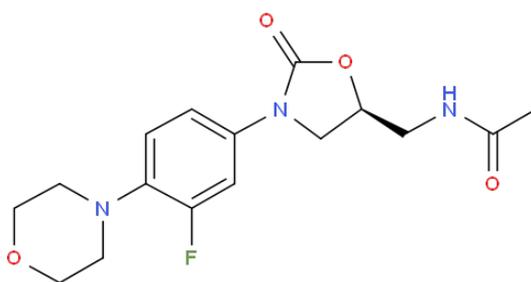
Existe evidencia de resistencia a la bedaquilina en *M. abscessus* por selección de mutaciones en el gen *atpE* de la ATP sintasa micobacteriana. Las mutaciones descritas por Kim y *col.* son dos cambios nucleotídicos que dan lugar a cambios aminoacídicos: cambio de asparagina por alanina en la posición 28 del gen; y cambio de alanina por prolina en la posición 63 [122]. Recientemente, Richard y *col.* [123] han descrito mutaciones en el gen *MAB\_2299c* como causantes de la resistencia a la bedaquilina en el complejo *M. abscessus*. Este gen, es un represor que inhibe la síntesis de una pareja de genes adyacente a él: *Mab\_2300-Mab\_2301*. Esta pareja de genes codifican para proteínas de membrana. En concreto, la pareja de genes *Mab\_2300-Mab\_2301* codifica para una proteína de membrana del tipo MmpL. En *M. tuberculosis* estas proteínas están descritas como bombas de eflujo para azoles, clofazimina y bedaquilina. Mutaciones en el gen que inhibe su expresión hace que el producto del gen *Mab\_2999c* no pueda unirse al ADN y no actúe como represor aumentando la expresión de la bomba de eflujo codificada por *Mab\_2300-Mab\_2301*.

## 1.2.6.6. Oxazolidinonas (linezolid)

### 1.2.6.6.1. Estructura química

Las oxazolidinonas son una nueva clase de compuestos antimicrobianos que concentran su actividad en el ribosoma bacteriano. La única oxazolidinona aprobada por la agencia estadounidense (FDA, Food and Drugs Administration) es el linezolid.

**Figura 18.** Estructura química del linezolid. Imagen tomada de ChemSpider (disponible en <https://www.chemspider.com/>).



### 1.2.6.6.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las oxazolidinonas consiste en unirse a la subunidad 30S del ribosoma. El linezolid se une al ARN ribosomal 23S interfiriendo con la entrada del ARN de transferencia al ribosoma y además interfiere con la peptidiltransferasa, cambiando su conformación [96]. El sitio de unión del linezolid al ribosoma está alineado con 8 nucleótidos del ARN ribosomal 23S y no se une con ninguna proteína del ribosoma [124].

### 1.2.6.6.3. Resistencia

El mecanismo de resistencia al linezolid está conferido por la alteración del centro de la peptidiltransferasa o la alteración alrededor del centro. Mutaciones en el gen *rrl* que codifica para el ARN ribosomal 23S cercanas al centro de la peptidiltransferasa confieren resistencia al linezolid en diferentes especies bacterianas.

Los 8 nucleótidos del ARN ribosomal 23S con los que interacciona el linezolid son: G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506, y U2585. Estos nucleótidos son universales y están empaquetados en conjunto alrededor del centro de la peptidiltransferasa [124]. En *M. smegmatis* los SNPs G2032C y A2453U sólo influyen en un pequeño incremento de la CMI del linezolid. En el mismo estudio se observó que algunas mutaciones puntuales en los nucleótidos G2032, A2453 y C2499 no producen grandes aumentos en la CMI del linezolid en el caso de *M. smegmatis*. Las mutaciones puntuales en estas tres posiciones no son capaces por si solas de explicar la resistencia al linezolid, ya que en algunas especies bacterianas dan resistencia mientras que en otras no. Por otro lado, las mutaciones en las posiciones 2503, 2504 y 2505 confirieron incrementos de hasta 8 veces en la CMI del linezolid. La posición 2504 interactúa directamente con el linezolid. Todas las demás mutaciones, que se dan en la segunda capa de nucleótidos muestran un ligero incremento de hasta 4 veces la CMI del Linezolid. A excepción de la mutación G2576U que da un aumento de hasta 32 veces. La mutación

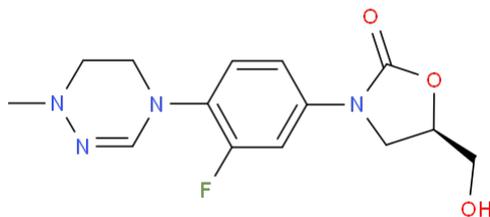
G2576U es la más prevalente en los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* y enterococos con resistencia al linezolid.

Aunque en la unión del linezolid a su diana no interviene ninguna unión a proteínas ribosómicas, mutaciones en estas proteínas que se encuentran cerca del centro de la peptidiltransferasa pueden dar lugar a resistencia. Cepas mutantes de *Staphylococcus aureus* con deleciones en la proteína L4 muestran CMI's reducidas al linezolid. También se han asociado mutaciones en la proteína L3 y mutaciones, que no deleciones, en la proteína L4 como las causantes de una disminución en la sensibilidad al linezolid. También existen casos de CMI's elevadas en los que no se ha demostrado ningún mecanismo molecular asociado con la resistencia a este compuesto químico [124,125]. En 2012 se observó la resistencia al Linezolid debido a una mutación en la posición 460 del gen *rplC* de *M. tuberculosis* que da lugar a un cambio de una timina por una citosina produciendo un cambio de cisteína por arginina en la posición 154 de la proteína L3 [126]. En *M. abscessus* no se han descrito las bases moleculares de la resistencia al linezolid.

El linezolid fue la primera oxazolidinona aprobada para el tratamiento de algunas micobacterias no tuberculosas entre ellas el complejo *M. abscessus*. Aunque el linezolid tiene un espectro amplio de actuación y ha sido aprobado para su uso en infecciones por *M. tuberculosis* y *M. abscessus*, tiene efectos adversos importantes. En 2017, Kim y col. describieron la acción de la LCB01-0371 (delpazolid), una nueva oxazolidinona,

contra *M. abscessus*, con resultados prometedores [122]. En este estudio, el delpazolid fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano no solo *in vitro* sino que también en el modelo de pulmones de ratones *in vivo* en comparación con el linezolid. También identificaron varias mutaciones en el gen *rplC* que causan resistencia al delpazolid. Un mutante presentaba resistencia por un cambio nucleotídico en la posición 424 de una timina por una cisteína del gen *rplC* que conlleva un cambio aminoacídico de cisteína por arginina en la posición 124 de la cadena peptídica (R124C). También observaron otras mutaciones en el gen *rplC*: el cambio de guanina (G) por adenina (A) en la posición 419 que se transforma en un cambio de glicina (G) por aspartato (D) en la posición peptídica 140 (G140D); y una inserción entre las posiciones 502 y 503 también mostraron resistencia al delpazolid en *M. abscessus*. Al final del estudio concluyen que esta nueva oxazolidinona es efectiva contra las cepas con fenotipo salvaje de *M. abscessus* tanto *in vivo* como *in vitro*. Además de mostrar que el delpazolid es un candidato muy prometedor para tratar las infecciones causadas por *M. abscessus*.

**Figura 19.** Estructura química de la nueva oxazolidinona LCB01-0371 (delpazolid). Imagen obtenida de ChemSpider (disponible en <https://www.chemspider.com/>).



## **1.2.6.7. Betalactámicos, cefalosporinas y carbapenémicos**

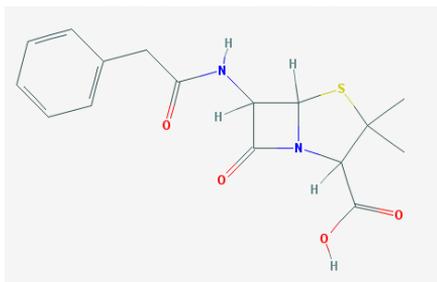
### **1.2.6.7.1. Estructura química**

Los carbapenémicos (como por ejemplo: Meropenem e Imipenem) y las cefalosporinas (como la Ceftriaxona, la Cefoxitina, o la Ceftarolina) son antibióticos de la familia de los betalactámicos.

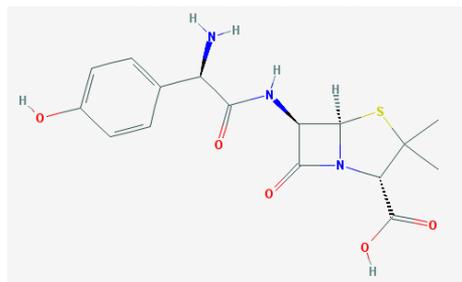
Los betalactámicos son compuestos químicos que contienen un anillo betalactámico en el centro de la molécula y actúan en la síntesis de la pared de peptidoglicano de las bacterias. Las cefalosporinas y carbapenémicos han sido modificados para tener un espectro más amplio de actuación y una mayor afinidad por la diana a la que se unen.

**Figura 20.** Estructura química de los betalactámicos (A y B), cefalosporinas (C y D) y carbapenémicos (E y F). Imágenes obtenidas de PubChem (disponibles en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

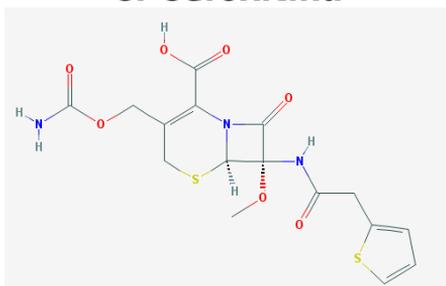
**A. Penicilina**



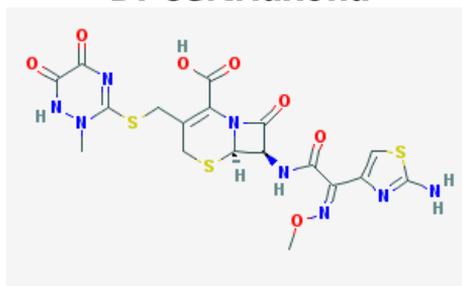
**B. Amoxicilina**



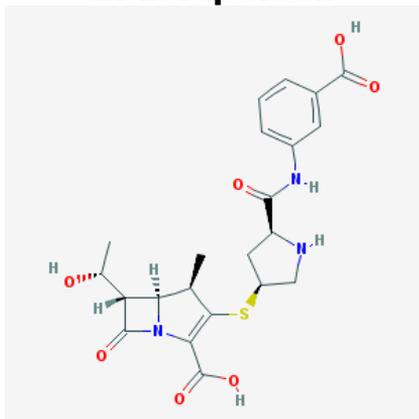
**C. Cefoxitina**



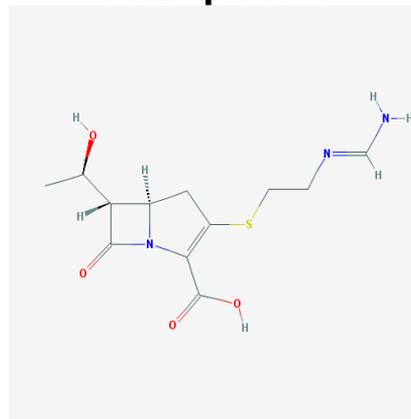
**D. Ceftriaxona**



**E. Ertapenem**



**F. Imipenem**



### **1.2.6.7.2. Mecanismo de acción**

Consiste en la inhibición de la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana. Los betalactámicos se unen de forma irreversible a las proteínas de unión de la penicilina o PBP (de sus siglas en inglés *Penicillin-Binding Proteins*). Las PBPs son responsables de la formación de puentes peptídicos intermoleculares que son requeridos para la nueva formación de peptidoglicano. Catalizan la unión entre la cuarta molécula (D-alanina) de una cadena y la tercera molécula (ácido *meso*-diamoniopimélico) de la otra cadena peptídica formando un enlace cruzado 4-3. Los betalactámicos bloquean la formación de estos enlaces desencadenando una respuesta de autodigestión del peptidoglicano maduro de la pared, a parte de inhibir la formación de nueva pared interrumpiendo la integridad de la pared. Las micobacterias, como otras bacterias, pueden hacer un enlace cruzado 3-3 a parte del enlace cruzado 4-3. Este enlace está catalizado por otro tipo de transpeptidasas diferentes de las PBP pero con función parecida. Existe evidencia de que los carbapenémicos son capaces de unirse a estas transpeptidasas de las micobacterias [96].

### 1.2.6.7.3. Mecanismo de resistencia

La resistencia intrínseca de las micobacterias a los betalactámicos es el resultado de combinar la baja permeabilidad de la pared celular, la baja afinidad de los betalactámicos por sus transpeptidasas del tipo PBP, y la presencia de betalactamasas capaces de degradar los betalactámicos. En concreto en *M. abscessus* la mayor parte de los enlaces cruzados de su pared son del tipo 3-3 utilizando transpeptidasas diferentes a las clásicas PBP [96,127].

El gran mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos es la producción de betalactamasas. Las betalactamasas son enzimas capaces de degradar los antibióticos betalactámicos. Los miembros del complejo *M. abscessus* son resistentes a la mayor parte de betalactámicos, a excepción del imipenem y la ceftoxitina. Esto se debe a la producción de un tipo de betalactamasa de clase A. Esta betalactamasa, codificada por el gen *MAB\_2875* y llamada  $BLA_{Mab}$ , es capaz de hidrolizar la mayor parte de los betalactámicos. También se ha observado como es capaz de hidrolizar lentamente el imipenem e incluso de forma extremadamente lenta la ceftoxitina, pero no lo suficientemente rápido para que no sean del todo activos. La betalactamasa  $BLA_{Mab}$  es capaz de evitar la inhibición por inhibidores de betalactamasas como el clavulanato, el tazobactam y el sulbactam. Tiene una capacidad más elevada de escapar la inhibición que la betalactamasa de *M. tuberculosis*. Los únicos inhibidores que han demostrado eficacia contra esta

betalactamasa son los nuevos inhibidores avibactam y vaborbactam. La combinación de los betalactámicos ampicilina y amoxicilina, y los carbapenémicos tebipenem y panipenem junto con avibactam han mostrado buena sinergia contra *M. abscessus*. Además la combinación de los carbapenémicos tebipenem y panipenem con el inhibidor vaborbactam también han mostrado una buena sinergia [36,78,128-130].

### **1.2.7. Pautas terapéuticas**

Actualmente las pautas de tratamiento de las infecciones causadas por las RGM están basadas en su sensibilidad antibiótica *in vitro*. El CLSI publicó en el 2011 su guía para realizar los ensayos *in vitro* de sensibilidad frente a RGM con los antibióticos que se deben probar y los puntos de corte establecidos. El comité europeo (EUCAST), por el contrario, aún no ha publicado sus recomendaciones ni puntos de corte para las micobacterias de crecimiento rápido. Según la guía americana los fármacos que se deben testar para el antibiograma de las RGM incluye: amikacina (AMI), cefoxitina (FOX), imipenem (IMI), moxifloxacino (MOX), meropenem (MEM), sulfametoxazol o trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), claritromicina (CLA), ciprofloxacino (CIP), doxiciclina/minociclina (DOX/MIN), linezolid (LZD) y tobramicina (TOB) (este último para los aislados de *M. chelonae*). Con respecto a la tigeciclina (TIG), se ha propuesto recientemente su implementación en un nuevo documento del CLSI pero no existen puntos de corte. Hay que tener en cuenta que las CMIs de los antibióticos del antibiograma de las RGM, y muy en especial de *M. abscessus*,

hay que medirlas a los 3 días para todos los fármacos a excepción de la claritromicina que se debe hacer la lectura a los 14 días. Esta última aclaración viene dada por el mecanismo inducible de resistencia a los macrólidos que está presente en el 100% de las cepas pertenecientes a *M. abscessus* subsp. *bolletii* y hasta el 80% de las cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* [82].

El tratamiento usado para las infecciones causadas por el complejo *M. abscessus* se basa en el uso por vía parenteral de amikacina, tigeciclina cefoxitina (el 70% de los aislados son sensibles) o imipenem combinado con el uso por vía oral de un macrólido: azitromicina o claritromicina para los aislados que no tengan un gen *erm(41)* funcional. En las infecciones pulmonares aún cuando los aislamientos tienen un gen *erm(41)* funcional se observa mejoría clínica utilizando claritromicina o dosis bajas de amikacina en un periodo corto en combinación con cefoxitina y/o tigeciclina o imipenem [60]. En la infección pulmonar causada por *M. abscessus*, los macrólidos son la base del tratamiento. Pero deben utilizarse en combinación con aminoglucósidos, fluoroquinolonas, imipenem, doxiciclina, tigeciclina, cefoxitina, cotrimoxazol o linezolid [78,82]. En algunos casos es necesaria la intervención quirúrgica para extirpar la infección localizada además de la terapia antimicrobiana. Dado que las tres subespecies del complejo tienen perfiles de sensibilidad a los antibióticos diferentes es imprescindible llegar a la identificación a este nivel.

El tratamiento recomendado para las infecciones cutáneas o en mucosas causadas por los miembros del complejo *M. abscessus* es una combinación terapéutica con un inicio de administración parenteral seguida de terapia por vía oral durante al menos 6 meses. Durante el tratamiento pueden surgir nuevas lesiones cutáneas que no son indicativas del fracaso terapéutico. Lo recomendable es obtener cultivos y continuar el tratamiento. En la mayoría de ellos casos esos cultivos son estériles a partir de un correcto tratamiento después de 6 a 8 semanas. Es importante drenar los abscesos e intervenirlos quirúrgicamente si es necesario. La correcta identificación de la subespecie es vital por la diferente respuesta que muestran al tratamiento farmacológico [45,60].

**Tabla 3.** Resumen de las pautas terapéuticas según la localización de la infección de *M. abscessus*. Tabla adaptada y actualizada de Lee y col. 2015 [18].

Tipo de infección	Pauta terapéutica recomendada	Duración	Referencia
Pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Macrólido</b> (claritromicina o azitromicina) + antimicrobiano intravenoso (amicacina, cefoxitina o imipenem) o linezolid.</li> <li>• <b>Amicacina + macrólido</b> + 1 fármaco intravenoso además de la amicacina (tigeciclina, cefoxitina o imipenem)</li> <li>• <b>Macrólido + amicacina inhalada</b> + linezolid o etambutol + rifampina o etambutol + moxifloxacino</li> </ul> <p>Con la presencia de un gen <i>erm(41)</i> funcional:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Claritromicina + amicacina</b> + cefoxitina +/- tigeciclina o imipenem</li> </ul>	<p>Continuar hasta que las muestras de esputo sean negativas para <i>M. abscessus</i> durante 12 meses</p> <p>Mínimo continuar terapia 6 meses</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Griffith y col. 2007</li> <li>• Novasod y col. 2016</li> <li>• Brown-Elliott &amp; Philley, 2017</li> </ul>
Piel y tejidos blandos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Macrólido + amicacina</b> + cefoxitina/imipenem + desbridamiento quirúrgico</li> <li>• Macrólido + tetraciclina o quinolona + tetraciclina o macrólido + quinolona</li> <li>• Amicacina o imipenem o cefoxitina intravenosa + macrólido + quinolona</li> </ul>	<p>Mínimo 4 meses (mínimo 2 semanas combinación fármacos intravenosos) para infección de piel. Mínimo 6 meses para la infección de huesos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Griffith y col. 2007</li> <li>• Novasod y col. 2016</li> <li>• Brown-Elliott &amp; Philley, 2017</li> </ul>
Sistema nervioso central	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Macrólido + amicacina</b></li> </ul>	<p>12 meses</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lee y col. 2012</li> </ul>
Bacteremia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Al menos 2 antibióticos (incluyendo amicacina) + retirada del catéter y/o retirar quirúrgicamente el foco de infección</li> <li>• Amicacina + macrólido + quinolona</li> <li>• Amicacina + macrólido o quinolona</li> </ul>	<p>4 semanas después del último resultado positivo del hemocultivo</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lee y col. 2015</li> <li>• El Helou y col. 2013</li> </ul>
Ocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agentes tópicos (amicacina o claritromicina) +/- fármacos antimicrobianos sistémicos (claritromicina oral + amicacina o cefoxitina intravenosa) y/o desbridamiento quirúrgico (dependiendo de la localización del punto de infección).</li> <li>• Ciprofloxacino tópico + lubricación</li> </ul>	<p>De 6 semanas a 6 meses</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lee y col. 2015</li> <li>• Kheir y col. 2015</li> </ul>

\* Marcado en negrita se encuentran las combinaciones más utilizadas.

### 1.2.8. Epidemiología

Se cree que el origen de las micobacterias se puede remontar hasta el periodo Jurásico hace 150 millones de años [131]. El complejo *M. tuberculosis* incluye especies con hábitat humano exclusivo y otras con hábitat animal. No existe un reservorio ambiental conocido. El genoma de *M. tuberculosis* es muy conservado y no tiende a aceptar ADN foráneo. En general, *M. tuberculosis* no sufre un intercambio horizontal de genes, su evolución es únicamente por mutación, dando lugar a poblaciones clonales y una dispersión clonal de ciertas cepas específicas [60,131].

Pero en el caso de las NTM, y en *M. abscessus* en concreto, el reservorio es ambiental, se ha demostrado el intercambio horizontal de genes y la contribución de este intercambio a su evolución [58]. El reservorio ambiental de *M. abscessus* no es conocido con precisión. Pero, tal como se ha comentado con anterioridad, la detección por WGS de un gran número de genes y operones asociados con la resistencia al arsénico o que codifican para desulfurasas de cisteína es una característica propia de bacterias que viven en el suelo y en hábitats acuáticos [43]. En los estudio de Thomson y *col.* de 2013 [132,133], se aíslan cepas ambientales de *M. abscessus* en el agua corriente y en piscinas. Los estudio más recientes describen aislamientos ambientales de *M. abscessus* en el hogar, especialmente en el polvo de casa y formando biofilms en la cocina y los baños [40,134]. Hay que destacar la

capacidad de supervivencia de *M. abscessus* en los fómites [40,136].

A pesar de la diversidad existente en *M. abscessus*, se ha descrito la existencia de clones predominantes a nivel global [32,77,135]. Estos clones se han aislado en pacientes con FQ en Estados Unidos, Reino Unido, Irlanda, Países Bajos, Suecia, Dinamarca, Australia, Malasia, Japón, Corea y Brasil. Pero también se han aislado estos clones en pacientes sin FQ [135]. La forma cómo estos clones han difundido alrededor del mundo se desconoce. El hecho de que se observen clones predominantes en las muestras clínicas de los pacientes a nivel mundial puede ser debido a su presencia universal en el ambiente y al hecho de que estos clones se seleccionan debido a su capacidad para dar infección en el hombre. Confirmar esta hipótesis en la actualidad es difícil dada la escasez de estudios en los que se investigue la presencia de *M. abscessus* en muestras ambientales.

En *M. tuberculosis* las cepas se transmiten de enfermo de tuberculosis pulmonar a huésped susceptible por vía aérea. Por ello, en los estudios poblacionales, es relativamente sencillo establecer las cadenas de transmisión.

*M. abscessus* se transmite desde su hábitat ambiental al huésped susceptible, no existiendo transmisión interhumana. En 2013, Bryant y cols. realizan una tipificación molecular por WGS de las cepas aisladas de pacientes de mucoviscidosis. El estudio sugiere la posibilidad de una transmisión interhumana de *M. abscessus* subsp. *massiliense* cambiando por tanto el paradigma epidemiológico previo. A pesar de ello, la existencia

de transmisión interhumana en *M. abscessus* es motivo de debate. Los estudios de Bryant y col. de 2013 y 2016 [32,137] describen la hipótesis de la transmisión directa de ciertas cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* entre pacientes de FQ en los centros en donde se hospitalizan. La hipótesis de la transmisión interhumana la sustentan con los datos del análisis de WGS y los datos de epidemiología de campo que demuestran la coincidencia temporo/espacial de los pacientes con cepas idénticas. Sin embargo, otros estudios encuentran cepas agrupadas aisladas de pacientes en los que no existió esta coincidencia temporo/espacial [138]. Sustentan que existen clones predominantes a nivel global en el ambiente a partir de los que se han infectado los pacientes de forma independiente. En el estudio realizado en el Great Ormond Street Hospital en Londres, se observa como el análisis de la WGS de los aislamientos de dos pacientes cumplen los criterios para afirmar transmisión interhumana, pero en el estudio epidemiológico de campo se observa que ambos pacientes son hermanos que comparten vivienda por lo que también sería posible un contagio de los dos pacientes a partir de un reservorio doméstico. Este hecho hace que no se pueda afirmar rotundamente que haya habido transmisión directa [136,138,139].

La existencia de un reservorio ambiental dificulta, en cualquier caso, la identificación de las cadenas de transmisión. En el caso de *M. abscessus*, teniendo en cuenta su reservorio ambiental es muy difícil encontrar todas las piezas de la cadena de transmisión en los estudios epidemiológicos. La falta de datos

de cepas ambientales, como hemos comentado previamente, en los casos en que se sospecha transmisión interhumana hace imposible determinar la transmisión directa.

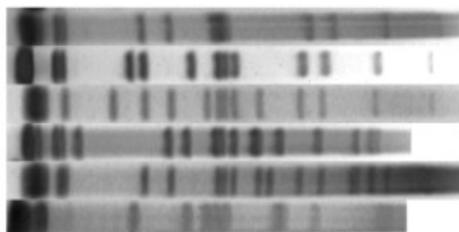
### **1.2.8.1. Marcadores moleculares para la tipificación**

#### **1.2.8.1.1. PFGE**

Existen diferentes técnicas que se pueden utilizar para la tipificación molecular de las bacterias. La más ampliamente utilizada es la técnica de electroforesis en campo pulsado o PFGE (de sus siglas en inglés *Pulse Field Gel Electrophoresis*) [59,131,140], basada en la digestión enzimática del ADN total de la célula por enzimas de restricción con baja frecuencia de corte. Dado el gran tamaño de los fragmentos obtenidos, no pueden separarse mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa sino que esta digestión se debe de correr en un gel de campo pulsado que permite la separación de bandas de hasta 50kb de tamaño. Compara las bandas obtenidas entre diferentes cepas basándose en que dos cepas relacionadas genéticamente deben de tener un perfil idéntico o prácticamente idéntico mientras que dos cepas no relacionadas tendrán cambios nucleotídicos o inserciones y deleciones en su genoma alterando su perfil de bandas [141]. Es una técnica muy laboriosa y lenta. Aunque la reproductibilidad de la técnica y el poder de discriminación son altos, es una técnica cara que requiere una experiencia considerable y grandes cantidades de ADN de alta calidad. Por lo cual se ha relegado a utilizar en laboratorios de referencia o científicos no asistenciales [131].

Por otra parte, los patrones de bandas obtenidos por PFGE son difícilmente exportables lo que dificulta su utilización en grandes bases de datos.

**Figura 21.** Imagen de electroforesis de en campo pulsado *M. abscessus*.

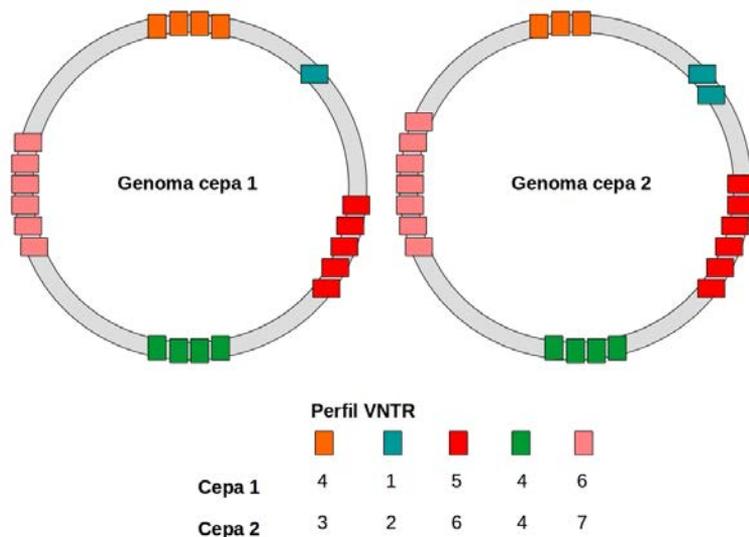


\* 6 cepas de *M. abscessus* sin una identificación a nivel de subespecie con perfiles de PFGE diferentes. Imagen adaptada de Machado y col. 2014 [142].

#### **1.2.8.1.2. VNTR**

Otra técnica utilizada en la tipificación de las cepas de *M. abscessus* es el estudio de los VNTR (*Variable Number of Tandem-Repeat*). Los VNTR son *loci* en los que existen repeticiones en tándem de secuencias de 9 a 100 pares de bases. El número de repeticiones existentes en un determinado *locus* se utiliza para determinar el alelo de este *locus*. El conjunto de los alelos es igual en cepas cercanas filogenéticamente mientras que varía entre cepas alejadas. En *M. abscessus* se necesitan utilizar al menos 17 *loci* [31,59,143]. El hecho de que los resultados se expresen en una secuencia numérica que representa el número de repeticiones en cada *locus* hace que el VNTR sea fácilmente exportable permitiendo la construcción de bases de datos globales.

**Figura 22.** Representación esquemática del análisis de VNTR de dos cepas hipotéticas.



En la figura 22 se puede observar una representación de lo que es el análisis de perfiles de VNTR. Se observa como el genoma de 2 cepas del mismo taxón los *loci* VNTR tienen diferente número de repeticiones al no tener ambas cepas una relación clonal.

El estudio de Yoshida *et al.* de 2014 describen como el VNTR es más discriminativo que el MLST en *M. abscessus*. Los autores enfatizan la existencia de cepas clínicas con perfiles de VNTR idénticos aisladas en diferentes localizaciones geográficas por lo que los pacientes no tienen una conexión aparente [144]. Este estudio de 2014 es uno de los primeros en utilizar una técnica de discriminación más potente que el MLST y encontrar agrupaciones de cepas de *M. abscessus* sin ninguna conexión epidemiológica.

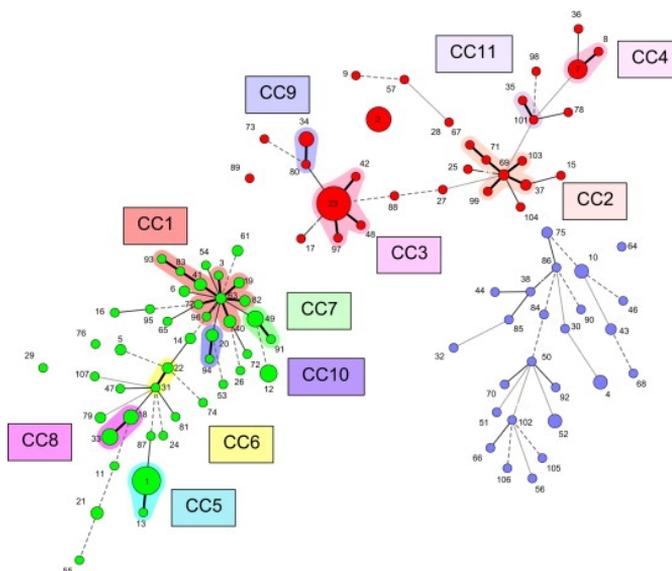
### 1.2.8.1.3. MLST

La tipificación mediante la secuenciación de diferentes genes estructurales o MLST (de sus siglas en inglés *Multilocus Sequence Typing*) es otra técnica de tipificación ampliamente utilizada en epidemiología molecular. La técnica se basa en la amplificación y secuenciación parcial de diferentes genes estructurales conservados. Esta técnica tiene en cuenta las diferencias nucleotídicas (SNP) en cada *locus* para asignarle un número de alelo. De esta forma cada alelo obtiene un número diferente en función de la posición del SNP y la sustitución (A,T,C,G). El hecho de que los resultados se expresen en una secuencia numérica que representa los distintos alelos encontrados hace que el MLST sea fácilmente exportable permitiendo la construcción de bases de datos globales. Existen diferentes esquemas propuestos de análisis de MLST para *M. abscessus* [145,146]. El más utilizado en *M. abscessus* es el descrito por Macheras y col. en 2014 [146]. Los resultados de este esquema se recogen por el “*Institut Pasteur MLST*” en el repositorio público de BIGSdb (disponible en <https://bigsd.bpasteur.fr/mycoabscessus/mycoabscessus.html>). Los genes estructurales que parcialmente se amplifican y secuencian son 7: *argH*, *cya*, *glpK*, *gnd*, *murC*, *pta* y *purH*. Esta base de datos consta en la actualidad de 234 secuencias únicas que en diferentes combinaciones dan lugar a 262 perfiles de MLST diferentes. Son 37 alelos de *argH*, 31 de *cya*, 28 de *glpK*, 32 de *gnd*, 36 de *murC*, 36 de *pta*, y 34 de *purH* en 262 combinaciones únicas. La base de datos contiene además

352 aislamientos de alrededor del mundo (a fecha de 5 de diciembre de 2018). Además, la base de datos es pública y cualquiera puede descargar esos datos para comparar los suyos con el resto del mundo. El análisis suele mostrarse con un árbol de expansión mínima o MST (de sus siglas en inglés *Minimum Spanning Tree*). En la figura 23 se observa un ejemplo de MST de cepas de *M. abscessus* comparadas utilizando esta base de datos.

El MLST permite a los laboratorios de todo el mundo situar nuevos aislamientos en su geografía en el contexto de la distribución global del complejo *M. abscessus*.

**Figura 23.** MST obtenido a partir del análisis de MLST de *M. abscessus* utilizando la base de datos del *Institut Pasteur MLST*. Imagen tomada de Macheras y col. 2014 [146].



\* En rojo los aislamientos de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, en azul los aislamientos *M. abscessus* subsp. *bolletii*, y en verde los aislamientos de *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Los números en los círculos corresponden al número de secuencia tipo (ST). El diámetro de los círculos tiene relación directa con el número de aislamientos que tienen el mismo ST. Los CC corresponde a complejos clonales.

#### **1.2.8.1.4. Secuenciación completa del genoma o WGS**

Por último, el análisis de la secuenciación completa del genoma permite también el estudio de los brotes con mayor precisión. El uso de la WGS permite determinar el número de cambios nucleotídicos o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) entre los genomas de diferentes aislamientos clínicos o cepas bacterianas. Los datos proporcionados por WGS tienen una mayor resolución que los datos que proporcionan las técnicas de PFGE, MLST o VNTR. Es capaz de encontrar diferencias en aislamientos que tienen el mismo perfil de MLST y VNTR [139,147].

El MLST permite observar las variaciones evolutivas de las bacterias desde una perspectiva más alejada con valor filogenético. Las cepas se distribuyen en complejos clonales. Ahora bien, cuando dos cepas comparten el mismo MLST no necesariamente serán clonales en el sentido de pertenecer a la misma cadena de transmisión.

El VNTR permite una observación más cercana. Los cambios en las repeticiones están sujetos a una deriva mayor que la que se observa en los genes estructurales conservados. Pueden haber cepas con un mismo ST pero diferente perfil de VNTR. Aún así ambas técnicas carecen del poder suficiente de resolución para poder afirmar que aquellas cepas agrupadas pertenecen a la misma cadena de transmisión. Esto es, tanto el MLST como el VNTR permiten descartar la transmisión cuando los perfiles son distintos (*rule out*) pero no permiten afirmarla cuando los perfiles son iguales (*rule in*).

La WGS tiene un poder de resolución mayor y los datos generados son exportables y suelen ser públicos (accesibles en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). La WGS permite analizar información de todo el genoma del organismo, con lo que es capaz de identificar virtualmente toda clase de marcadores moleculares. Permite hacer todos los niveles de estudio, desde poblaciones (a nivel global), comunidades (más reducido), clones e incluso la evolución de la misma cepa dentro del mismo paciente o el estudio de subpoblaciones dentro de los aislados del mismo paciente [131]. Teóricamente la WGS permitiría tanto descartar como afirmar una determinada cadena de transmisión. Ahora bien, en los microorganismos con reservorio humano exclusivo y transmisión inter-humana (como por ejemplo *M. tuberculosis*), para poder identificar una cadena de transmisión es suficiente con disponer de todas las cepas que dan lugar a infección en la población estudiada (estudios poblacionales). Mientras que, en los microorganismos como *M. abscessus* con reservorio ambiental y sin transmisión inter-humana, sería necesario disponer de los datos de las cepas ambientales para poder definir con precisión las rutas de transmisión de las agrupaciones clonales detectadas.

## **1.2.8.2. Brotes descritos**

### **1.2.8.2.1. Brotes asociados a infección cutánea**

Los brotes de *M. abscessus* que causan infecciones cutáneas están asociados a la inoculación del microorganismo mediante procedimientos como cirugía estética, tatuajes, liposucciones o mesoterapia. Estos brotes se dan por la contaminación por *M. abscessus* del material o las soluciones usados en esos casos. Normalmente, la infección cutánea se da en pacientes sanos sin tener ningún factor predisponente [148-152].

El brote más extenso de infección cutánea por *M. abscessus* está descrito en Brasil entre 2006 y 2008. Se identificaron 2032 casos de infección por una única cepa de *M. abscessus* subsp. *massiliense* (clon BRA100) en 63 hospitales diferentes de Brasil [152-156]. No se ha identificado el reservorio de la cepa responsable del brote. Se cree que contribuyó a la expansión del brote la tolerancia del clon BRA100 al glutaraldehído, que hace muy difícil la desinfección y esterilización de los equipos cuando se utiliza este antiséptico [155].

En nuestra geografía, Garcia-Navarro y *col.* describieron un brote en Barcelona causado por *M. abscessus* en 2008. Los autores describen la infección cutánea por *M. abscessus* en 13 pacientes. Los 13 pacientes descritos se sometieron a sesiones de mesoterapia en la misma clínica durante el mismo periodo. En este caso tampoco se pudo identificar el reservorio de la cepa responsable del brote [157].

### **1.2.8.2.2. Brotes asociados a infección pulmonar**

Los brotes de *M. abscessus* asociados a infección pulmonar están asociados a centros con pacientes de FQ. Para la infección pulmonar es necesario que el huésped tenga factores predisponentes [35]. Como se ha comentado previamente, existe debate entre la transmisión directa de paciente a paciente o la adquisición de un clon predominante ambiental, pero la realidad es que se han descrito brotes de *M. abscessus* en pacientes con FQ [154]. Se han descrito cepas analizadas por WGS que presentan rasgos de clonalidad en pacientes diferentes [32,135,137]. Se han producido brotes de *M. abscessus* en hospitales de diferentes lugares: Brasil, Taiwán, Corea, Gran Bretaña y Estados Unidos entre otros [32,137,140,153,154,158,159]. Las causas de transmisión propuestas serían la contaminación por *M. abscessus* de los desinfectantes, la transmisión entre pacientes o la exposición a agua del grifo [60,137,153].

El primer brote de infección respiratoria causada por *M. abscessus* fue descrito por Aitken y *col.* en 2012 [160]. El estudio describe la adquisición del mismo clon de *M. abscessus* subsp. *massiliense* por 4 pacientes del mismo centro de FQ en Seattle, Estados Unidos.

El brote de 2013 en el hospital de Papworth en Reino Unido estudiado por WGS por Bryant y *col.* [137] fue la primera vez en que se hipotetizó sobre la transmisión directa entre pacientes. En el estudio observaron 2 agrupaciones de 2 y 9 pacientes con cepas *M. abscessus* subsp. *massiliense*

genéticamente idénticas. En el estudio de epidemiología de campo son capaces de establecer la posible cadena de transmisión entre los pacientes ya que todos coincidieron en el mismo marco espacio/temporal.

## **2.OBJETIVOS**

Los objetivos de la tesis se dividen en tres bloques.

### **I. Identificación:**

- Valoración de la PCR-secuenciación (Sanger) de cuatro genes estructurales, y la espectrometría de masas (MALDI-TOF) en la identificación de las cepas de *M. abscessus* a nivel de subespecie.

### **II. Resistencia a los antibióticos**

- Epidemiología de la resistencia en los aislamientos de Barcelona.
- Comparación de la técnica de microdilución en caldo con el E-Test para el estudio de las resistencias de los aislamientos clínicos del complejo *M. abscessus*.
- Estudio de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia

### **III. Epidemiología molecular**

- Análisis de la diversidad observada mediante MLST, VNTR y WGS.
  - Estudio de las agrupaciones clonales detectadas para determinar las cadenas de transmisión.
  - Análisis de cepas aisladas del mismo paciente a lo largo del tiempo para diferenciar la infección crónica de la reinfección.



### 3. HIPÓTESIS

El uso de la secuenciación de Sanger de cuatro genes estructurales y la espectrometría de masas MALDI-ToF en el complejo *M. abscessus* permite la identificación a nivel de subespecie. La resistencia de las cepas del complejo *M. abscessus* a los antibióticos es muy elevada. El E-test tiene una eficiencia similar a la microdilución para el estudio de las CMI de los antibióticos. Los mecanismos moleculares asociados a la resistencia antibiótica en el complejo *M. abscessus* se encuentran en: macrólidos genes *erm(41)* y *rrl*, aminoglucósidos *rrs*, *MAB\_3168c* y *rpsL*, quinolonas *gyrA* y *gyrB*, y linezolid *rrl*, *rplC*, *rplD* y *rplV*. El análisis por VNTR y MLST de las cepas de *M. abscessus* permite identificar las cepas con perfil único pero no afirmar que las cepas agrupadas formen parte de una cadena de transmisión. El análisis por WGS de las cepas de *M. abscessus* permite tanto afirmar como descartar las posibles cadenas de transmisión.



## **4.MATERIALES Y MÉTODOS**



## **4.1. Muestras y ámbito de estudio**

Para este estudio se ha dispuesto de 13 extracciones de ADN pertenecientes a aislamientos de 11 pacientes y 36 cepas pertenecientes a aislamientos de 33 pacientes obtenidos entre 1995 y 2015. Tres aislamientos fueron de muestras de piel, 43 fueron de muestras pulmonares, un aislamiento fue de sangre y 2 no se pudo obtener la información de procedencia.

En el apartado de secuenciación masiva utilizamos 36 cepas de Barcelona de 33 pacientes junto con 108 secuencias de cepas aisladas en el Great Ormond Street Hospital (Londres, Reino Unido) de 32 pacientes.

La tabla 4 muestra los aislamientos de Barcelona utilizados en todo el estudio. En la tabla se muestran los identificadores, el tipo de muestra que disponíamos, la fecha del aislamiento, el hospital en el que se aisló (HSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; HCl: Hospital Clínic de Barcelona; HVH: Hospital de la Vall d'Hebron), la procedencia de la muestra y si el paciente sufre de fibrosis quística o se le ha hecho una intervención de trasplante de pulmón.

**Tabla 4.** Resumen de los aislamientos de Barcelona utilizados en este estudio.

Paciente	Muestra	Identificador	Fecha aislamiento	Procedencia	Hospital	Fibrosis quística / Transplante de pulmón
1	Cepa	ben-hsp-013	05/06/2007	Pulmón	HSP	No
1	ADN	101281	24/10/2010	Pulmón	HSP	No
1	ADN	131330	08/10/2013	Pulmón	HSP	No
1	Cepa	ben-hsp-028	30/06/2014	Pulmón	HSP	No
2	Cepa	ben-hsp-015	24/03/2009	Pulmón	HSP	No
2	ADN	111110	23/02/2011	Pulmón	HSP	No
2	ADN	111441	12/12/2011	Pulmón	HSP	No
2	Cepa	ben-hsp-029	20/12/2015	Pulmón	HSP	No
3	Cepa	ben-hsp-016	17/09/2009	Pulmón	HSP	No
3	Cepa	ben-hsp-027	05/07/2011	Pulmón	HSP	No
4	ADN	041462	22/12/2004	Pulmón	HSP	No
4	ADN	051586	24/11/2005	Pulmón	HSP	No
5	Cepa	ben-hsp-011	01/12/1995	Pulmón	HSP	No
6	ADN	141016	17/01/2014	Pulmón	HSP	No
7	ADN	071004	03/04/2007	Piel	HSP	No
8	ADN	051284	15/07/2005	Piel	HSP	No
9	Cepa	ben-hsp-012	31/10/2008	Pulmón	HSP	No
10	ADN	101050	18/02/2010	Pulmón	HSP	No
11	ADN	061323	20/08/2006	Pulmón	HSP	No
12	ADN	091456	04/12/2009	Pulmón	HSP	No
13	Cepa	ben-hsp-014	03/10/1997	Pulmón	HSP	No
14	Cepa	ben-hsp-019	23/01/2014	Pulmón	HSP	No
15	ADN	141069	13/03/2014	Piel	HSP	No
16	Cepa	ben-hsp-021	24/04/2015	Pulmón	HSP	No
17	Cepa	ben-hcl-001	23/02/2013	N/A	HCL	N/A
18	Cepa	ben-hcl-002	30/12/2013	Pulmón	HCL	Fibrosis quística
19	Cepa	ben-hcl-003	27/03/2013	N/A	HCL	N/A
20	Cepa	ben-hcl-004	09/05/2013	Pulmón	HCL	No
21	Cepa	ben-hcl-005	01/08/2014	Pulmón	HCL	No
22	Cepa	ben-hcl-006	20/10/2014	N/A	HCL	N/A
23	Cepa	ben-hcl-007	10/09/2014	Sangre	HCL	No
24	Cepa	ben-hcl-008	30/06/2014	Pulmón	HCL	No
25	Cepa	ben-hcl-009	08/05/2013	Pulmón	HCL	No
26	Cepa	ben-hvh-030	09/01/2012	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
27	Cepa	ben-hvh-031	06/05/2009	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
28	Cepa	ben-hvh-033	15/07/2013	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
29	Cepa	ben-hvh-034	23/01/2009	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
30	Cepa	ben-hvh-035	14/02/2014	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
31	Cepa	ben-hvh-036	22/12/2004	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
32	Cepa	ben-hvh-037	30/01/2013	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
33	Cepa	ben-hvh-038	25/07/2014	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
34	Cepa	ben-hvh-039	22/01/2007	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
35	Cepa	ben-hvh-040	04/09/2009	Pulmón	HVH	Fibrosis quística
36	Cepa	ben-hvh-041	29/08/2012	Pulmón	HVH	Transplante pulmonar
37	Cepa	ben-hvh-042	18/04/2012	Pulmón	HVH	Transplante pulmonar
38	Cepa	ben-hvh-043	23/02/2013	Pulmón	HVH	Transplante pulmonar
39	Cepa	ben-hvh-045	10/04/2013	Pulmón	HVH	Transplante pulmonar
40	Cepa	ben-hvh-046	08/11/2013	Pulmón	HVH	Transplante pulmonar
41	Cepa	ben-hvh-047	28/03/2013	Pulmón	HVH	Transplante pulmonar

## **4.2. Cultivo de las cepas del complejo *M. abscessus***

El manejo de los aislamientos clínicos y/o las cepas pertenecientes a *M. abscessus* se realiza en cabina de seguridad de tipo 2 de clase A. Con las medidas de protección de barrera adecuadas, llevando mascarilla de protección, doble guante de goma y bata de laboratorio.

Los aislamientos clínicos fueron conservados en medio de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El cultivo de las micobacterias se realizó descongelando el medio de congelación a temperatura ambiente y sembrando 100  $\mu\text{l}$  en tubos de cristal con medio sólido de cultivo Löwenstein-Jensen (Becton Dickinson) y 100  $\mu\text{l}$  en medio líquido de cultivo MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, Becton Dickinson) añadiendo MGIT PANTA como complemento para evitar el crecimiento de hongos u otras bacterias no tuberculosas tal y como se especifica en las instrucciones del fabricante y en el MGIT Procedure Manual [161].

Los cultivos de Löwenstein-Jensen se incubaron en estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  en posición inclinada semi-horizontal de 3 a 5 días hasta observar el crecimiento de bacterias. Los cultivos de MGIT se incubaron en un incubador Bactec (Becton Dickinson) a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta positivizar.

## **4.3. Inactivación de las micobacterias**

Las muestras de *M. abscessus* se deben inactivar para poder trabajar en el laboratorio de biología molecular. La inactivación de las cepas crecidas se realiza haciendo una suspensión de 3 hasas de cultivo sólido en 200  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril (Braun) en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Para la inactivación se colocan los tubos en el baño a  $80\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Si partimos de cultivo en medio líquido se hace una suspensión de 200  $\mu\text{l}$  con una concentración al

0.5 McFarlan y después se procede a la inactivación colocando los tubos en el baño a  $80^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.

#### **4.4. Extracción de ADN genómico para PCR**

Una vez inactivadas las bacterias en suspensión, la extracción del ADN se realiza de formas diferentes detalladas en el Anexo III. Para la amplificación por PCR utilizamos la extracción por choque térmico o la extracción utilizando InstaGene Matrix (BioRad) correspondientes a los Protocolos 1 y 2 del Anexo III.

#### **4.5. Amplificación por PCR**

Los detalles de la técnica de amplificación por PCR se encuentran en el Anexo IV. El Anexo V muestra los protocolos utilizados para cada uno de los genes amplificados por PCR. La amplificación por PCR de todos los genes se realizó utilizando la polimersa *Taq DNA Polymerase* de *Thermos aquaticus* BM, *E. coli* recombinante (Roche). Las secuencias nucleotídicas utilizadas como iniciadores se describen en la tabla 5. Los iniciadores específicos de esta tesis se diseñaron utilizando los genes de la cepa de referencia *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977 mediante el programa Primer 3 [162].

#### **4.6. Electroforesis de corriente continua en gel de agarosa al 1%**

Una vez obtenido el producto de amplificación de la PCR detectamos los amplificados o amplicones mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2%. Utilizando 200 ml de tampón TBE al 0,5X, 2 mg de agarosa MP (Roche, España), y 5  $\mu\text{l}$  de Bromuro de Etidio (agente intercalante de ADN con la propiedad de emitir fluorescencia cuando se aplica luz ultravioleta). Los protocolos para la elaboración del gel y la electroforesis están detallados en el anexo IV.

## 4.7. Purificación de los productos de PCR

Antes de poder secuenciar los productos de la amplificación por PCR es necesario purificarlos para eliminar el exceso de iniciadores y de dNTPs. La purificación se realizó utilizando los kits comerciales de purificación de ADN *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, España) y *ExoSAP-IT PCR Purification Cleanup Reagent* (ThermoFisher Scientific). Los detalles de cada método se encuentran en el Anexo IV.

## 4.8. Secuenciación de Sanger

La secuenciación de Sanger de todos los genes se realizó siguiendo los pasos especificados por MacroGen Europe (Amsterdam, Holanda) para la preparación y envío de los amplificadores purificados ([https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces\\_sample\\_submission.jsp](https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_submission.jsp)).

## 4.9. Análisis de los resultados de secuenciación

Los resultados de secuenciación se descargan en archivos de formato AB1 y se analizaron y editaron con el programa BioNumerics v7.6 (AppliedMaths, disponible en <http://www.applied-maths.com/>). Por cada muestra se obtienen dos secuencias: secuencia *forward* (dirección 5' - 3') y secuencia *reverse* (dirección 3' - 5'). Estas dos secuencias se ensamblan en el programa creando un contig con una secuencia consenso. Posteriormente, las secuencias se compararon con la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando la herramienta BLAST (disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 4.10. Identificación de las subespecies del complejo

Los genes *rpoB*, *secA1*, *sodA*, y *hsp65* descritos en la tabla 5 fueron amplificados y analizados tal y como se describe en la literatura [43,56,163–165]. Después de obtener las secuencias, las comparamos utilizando el BLAST con las secuencias de referencia de la tabla 6 y creamos una tabla de homología. La determinación de la subespecie de cada cepa se realizó como se describe en el artículo de Macheras y col. de 2009 [43]. La subespecie se determina por el consenso de los 4 genes estudiados. En caso de que los 4 genes no correspondan a la misma subespecie, la subespecie se asigna por consenso a la subespecie a la que pertenecen la mayoría de estos genes. La tabla 5 recoge los iniciadores utilizados para amplificar los genes estructurales par ala identificación, l alongitud del fragmento esperado y la referencia de dónde se ha extraído.

**Tabla 5.** Descripción de los genes utilizados en la clasificación en subespecies de los organismos pertenecientes al complejo *M. abscessus*.

Gen	Iniciadores	Secuencia	Función	Longitud (pb)	Referencia
<i>rpoB</i>	MYCOF MYCOR	GGCAAGGTCACCCCGAAGGG AGCGGCTGCTGGGTGATCATC	Subunidad beta de la RNA polimerasa	723	Adekambi y Drancourt 2003
<i>hsp65</i>	TB11 TB12	ACCAACGATGGTGTGCCAT CTTGTCGAACCGCATAACCT	Proteína de choque térmico	441	Telenti y col. 1993
<i>sodA</i>	sodigF sodigR	GAAGGAATCTCGTGGCTGAATAC AGTCGGCCTTGACGTTCTTGATC	Superóxido dismutasa	541	Adekambi y Drancourt 2003
<i>secA1</i>	secA1-F secA1-R	AGTGGATGGGCCGCGTGCACCG CGCGGACGATGTAGTCCTTGTC	Subunidad SecA 1 de la Preprotein-translocasa	491	Conville PS y col. 2006

## 4.11. Secuencias de referencia

Las secuencias de referencia utilizadas para las comparaciones usando BLAST(NCBI) fueron la cepa de referencia de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977 (Número de acceso en el GenBank CU458896.1), la cepa de referencia de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CCUG50184 (Números de acceso en el GenBank AY859692 para el

gen *rpoB* y FJ442839.1 para el gen *secA1*), la cepa de referencia de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CIP108541 (Números de acceso en el GenBank EU266576.1 para el gen *hsp65* y AY862403 para el gen *sodA*), y la cepa de referencia de *M. abscessus* subsp. *massiliense*CCUG48898 (Números de acceso en el GenBank AY593981 para el gen *rpoB*, AY596465.1 para el gen *hsp65*, NZ\_AKVF01000005.1 para el gen *secA1* y AY593975 para el gen *sodA*).

En la tabla 6 se recogen los diferentes números de acceso a los genes específicos estudiados para la clasificación en subespecies.

**Tabla 6.** Secuencias de cepas de referencia de las 3 subespecies del complejo *M. abscessus*.

Subespecies	<i>rpoB</i>	<i>hsp65</i>	<i>sodA</i>	<i>secA1</i>
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	CU458896.1	CU458896.1	CU458896.1	CU458896.1
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	AY859692	EU266576.1	AY862403	FJ442839.1
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	AY593981	AY596465.1	AY593975	NZ_AKVF01000005.1

## 4.12. Identificación de micobacterias mediante MALDI-TOF MS

La identificación por espectrometría de masas de las subespecies del complejo *M. abscessus* de nuestro estudio se llevó a cabo en la *Mayo Clinic* (Rochester, Minnesota, Estados Unidos), por el equipo de la doctora Wengenack en 27 de nuestras cepas. Utilizaron su protocolo de extracción y con una base de datos personalizada [48]. En este apartado utilizamos 27 de los 33 primeros aislamientos clínicos de Barcelona.

El protocolo de extracción de proteínas para *M. abscessus* se llevó a cabo a partir de un cultivo reciente de las cepas en medio sólido. Entonces, se utilizó un asa de siembra estéril de 1 µl para coger la

cepa. Se mezcló el contenido del asa en 500 µl de etanol al 70% que contenía 0,05 ml de perlas de silicio de 0.1 mm. Después se incubó el espécimen durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente, la cepa se lisó mecánicamente mediante un homogeneizador durante 2 minutos. Se descartó el supernatante de la disolución tras una centrifugación de 5 minutos a 20.800 g y el contenido del tubo se secó utilizando un *SpeedVac* (Eppendorf, Hauppauge, Nueva York) durante 10 minutos. Se añadieron 20 µl de ácido fórmico al 70% y vórtex de 10 segundos seguido de la adición de 20 µl de acetronitrilo (Sigma-Aldrich). Después se le aplicaron 10 segundos de vórtex al tubo y se depositó 1 µl de la suspensión en la placa de 96 pocillos de MALDI-ToF y se dejó secar a temperatura ambiente. Después cada pocillo fué rellenado con 2 µl de la solución de matriz (Bruker Daltonics).

Seguidamente se obtuvieron e identificaron los perfiles utilizando los ajustes predeterminados del sistema MALDI *Biotyper* 3.0 *Microflex* LT (Bruker Daltonics). Los espectros fueron analizados con la librería v3.3.1.0 del programa *flexControl* v3.0, suplementada con la librería comercial (Bruker) específica de micobacterias (v2.0). Además se añadió una librería personalizada conteniendo un total de 479 entradas de micobacterias pertenecientes a 162 especies y subespecies, 232 entradas de *Nocardia* de 53 especies, y 185 entradas de 13 géneros con 43 especies de actinomicetos aeróbicos. Tal y como se recoge en el artículo de Bulkwalter y *col.* 2016 [48].

## **4.13. Identificación por secuenciación masiva**

La identificación de los aislados se realizó por secuenciación masiva en el Great Ormond Street Hospital (Londres, Reino Unido). Esta técnica consta de diferentes partes:

### **4.13.1. Extracción del ADN de alta calidad**

En este paso utilizamos un kit de extracción que elimina la mayor parte de las impurezas y nos deja ADN de cadena doble. Los detalles de la técnica se encuentran descritos en el Protocolo 3 del Anexo IV.

### **4.13.2. Preparación de la librería genética**

La preparación de la librería genética se realiza fragmentando de forma aleatoria el ADN en fragmentos de 500 a 2000 pb. Después se le añaden adaptadores en ambos extremos de los fragmentos de doble hélice. En nuestro caso con el kit Nextera DNA Library Preparation kit (Illumina) utilizamos el método de la tagmentación que realiza la fragmentación aleatoria junto con la ligación de los adaptadores al mismo tiempo. Los detalles del protocolo para la preparación de la librería se encuentran en el Anexo VI. Los fragmentos con los adaptadores ligados son amplificados por PCR y purificados.

### **4.13.3. Generación de agrupaciones (Clusters)**

Una vez cargada la librería en el secuenciador, las secuencias son capturadas en la *flow cell* del secuenciador por oligonucleótidos complementarios a los de los adaptadores. Cada fragmento es amplificado en clusters clonales, cruzados a través de la amplificación en puente. Cuando se acaban de generar los clusters, los modelos (*templates*) están preparados para la secuenciación.

Esta técnica aumenta la detección de las señales emitidas en la secuenciación.

#### **4.13.4. Secuenciación**

La tecnología de secuenciación de Illumina utiliza un método basado en nucleótidos con terminadores reversibles que detecta cada nucleótido a medida que se van incorporando en los *templates* de ADN.

Cada ciclo de la secuenciación añade un nucleótido con una modificación que hace que no se puedan añadir más nucleótidos en ese ciclo. Cuando acaba el ciclo se revierte la modificación convirtiéndolo en un dNTP al cuál se le pueden unir otros nucleótidos. En cada ciclo se detectan los nucleótidos que se han unido y se anotan en el archivo de la secuenciación. Al finalizar los 151 ciclos, se obtienen millones de secuencias de 151 pb como máximo. Cada base es el resultado de la lectura de 1 ciclo, por eso las lecturas en el secuenciador NextSeq 550 son lecturas cortas o *short reads*.

#### **4.13.5. Identificación de la subespecie utilizando las diferencias de SNPs en el *core genome***

Para el análisis de los datos de la secuenciación contamos con una WorkStation Azken PC con procesador de doble núcleo AMD Opteron(tm) 6320 de 2,80 Ghz, memoria RAM de 16 GB y sistema operativo ubuntu 16.04.

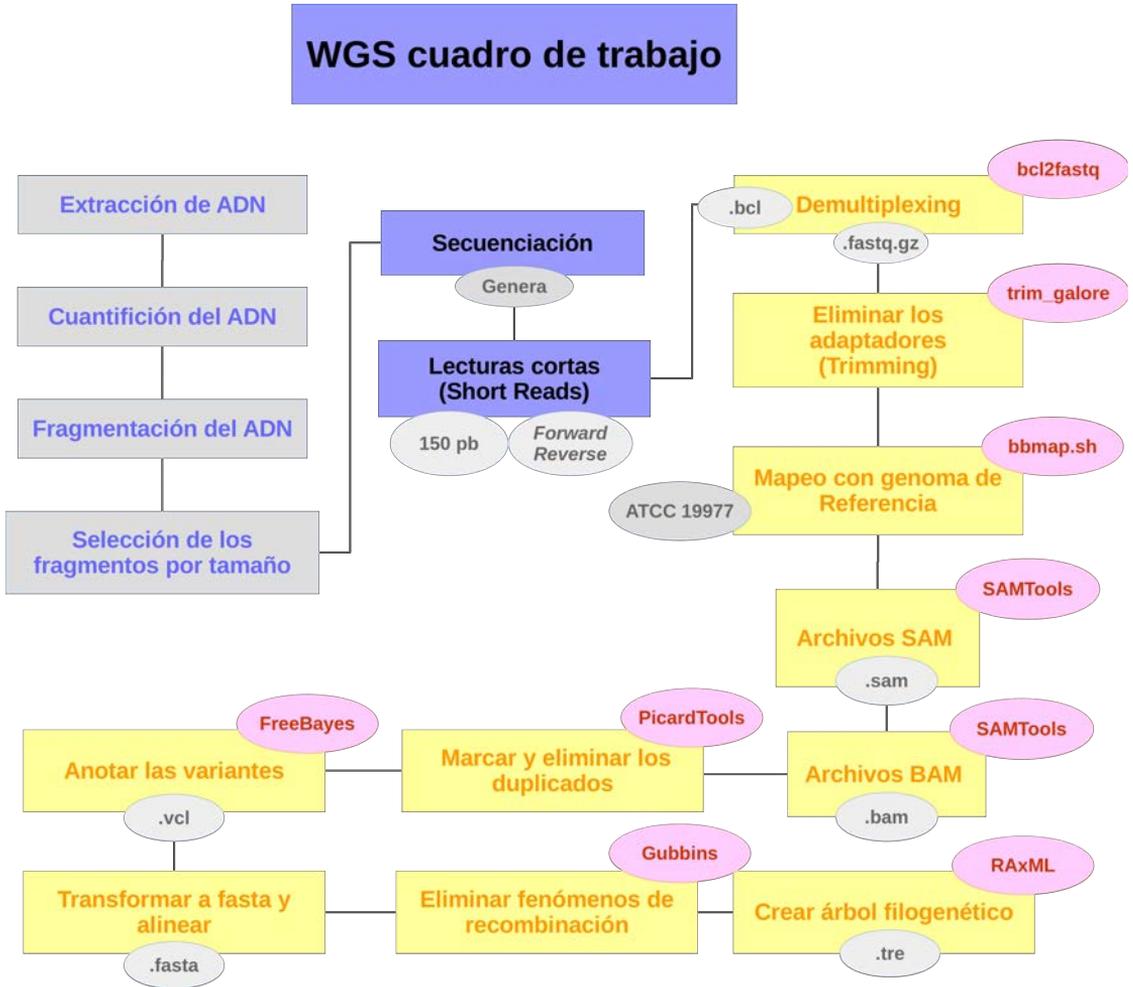
Los datos directamente obtenidos por el secuenciador NextSeq 550 fueron demultiplexados utilizando el software bcl2fastq v2.17 (Illumina). Los short reads fueron entonces mapeados al genoma de referencia de *M. abscessus* utilizando BMap v36.20 (Joint Genome Institute). Los archivos SAM (Mapas de alineamiento genético, siglas

del inglés *Sequence Alignment Map*) producidos fueron ordenados e indexados para producir archivos BAM (Mapa de Alinamiento Binario, del inglés *Binary Alignment Map*) utilizando el *software* SAMtools v1.6 [166]. Para marcar y eliminar los duplicados utilizamos Picard-tools (disponible en <http://broadinstitute.github.io/picard/>). Utilizamos el programa FreeBayes v1.1.0 [167] para crear los archivos VCF (archivos en formato para marcar las variantes, del inglés *Variant Calling Format*) a partir de cada uno de los archivos BAM especificando el modo haploide cuando buscábamos las variantes en cada una de las secuencias de las cepas. Cada secuencia se alinea con la secuencia de referencia y se marcan las variantes de la secuencia de la cepa frente a la secuencia de referencia en un archivo. Las variantes del archivo VCF se analizaron para retener los SNPs basándonos en las siguientes condiciones: la fracción mínima para apoyar un alelo alterno dentro de un mismo individuo con tal de evaluar la posición era mayor de 0,4; la calidad mínima en el mapeado de cada base era mayor de 30; la calidad mínima de cada base era mayor de 30. Luego se pasaron cada uno de los archivos en formato VCF a archivos fasta que contenían el genoma de referencia de *M. abscessus* pero en dónde se ha modificado cada posición dónde se ha encontrado una variante con esa variante. Después se enmascararon los nucleótidos que eran iguales y estaban en la misma posición en el 75% de las cepas o tenían una baja cobertura ( $< 5x$ ) en todo el conjunto de datos. Seguidamente, se juntaron todos los archivos en un único archivo en formato multifasta. Entonces, utilizamos el programa Gubbins v2.3.2 [168] para predecir y eliminar los posibles efectos de recombinación. Por último, el archivo generado por Gubbins se utilizó como input para crear un árbol filogenético de máxima verosimilitud en el programa RaxML v8.2.4 [169] utilizando el modelo GTRCAT y

utilizando un bootstrap de 100. Los detalles del *script* utilizado para el análisis bioinformático se encuentran en el Anexo VII.

Con el árbol obtenido observamos la diferenciación de las 3 subespecies en 3 ramas principales. La agrupación de las cepas quiméricas con las demás cepas no quiméricas indica la pertenencia a esa subespecie de las cepas de esa rama.

**Figura 24.** Organigrama resumen de los pasos a seguir en un experimento de WGS. Figura adaptada del artículo de Ekblom y col. 2014 “A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation” [170].



\* Los rectángulos en azul claro se refieren a los pasos de preparación del ADN genómico; los recuadros en amarillo se refieren a los procesos bioinformáticos; las elipses de color azul claro hacen referencia al tipo de archivo (la terminación de archivo) que se genera; las elipses de color rojo hacen referencia al programa (software) utilizado en ese paso; la elipse azul oscuro hace referencia al genoma de referencia utilizado.

## 4.14. Test de susceptibilidad antibiótica

La prueba de susceptibilidad antibiótica se realizó de dos formas diferentes. Las pruebas de susceptibilidad mediante E-test se realizaron en 17 cepas. El test de microdilución en caldo ajustado de cationes Müller-Hinton (CAMHB, de sus siglas en inglés *Cation Adjusted Müller-Hinton Broth*) se realizó en placas Sensititre RAPMYCOI (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, United Kingdom) a 36 cepas (los 33 primeros aislamientos y las 3 cepas de seguimiento de 3 pacientes) tal y como se especifica en las guías del CLSI (M24-A2). Las lecturas de todos los antibióticos fueron a los 3 días con la excepción de la claritromicina, en la que se repitió lectura a los 3, a los 7, y a los 14 días, como viene recomendado por el CLSI [82]. Los puntos de corte para la técnica de E-test fueron los descritos por Biehle y *col.* en 1995 [171]. Los puntos de corte utilizados para el antibiograma mediante la técnica de microdilución fueron los descritos por Broda y *col.* en 2013 [80].

La tabla 7 muestra las cepas en las que se realizaron los test de susceptibilidad antibiótica. A excepción del E-test de susceptibilidad antibiótica que se realizó en 23 cepas (las 14 que se muestran en la tabla del artículo y 9 más).

**Tabla 7.** Cepas utilizadas en los tests de sensibilidad antibiótica.

Identificador	Test utilizado	Identificador	Test utilizado
bcn-hsp-013	E-test + Microdilución	bcn-hcl-008	E-test + Microdilución
bcn-hsp-028	Microdilución	bcn-hcl-009	E-test + Microdilución
bcn-hsp-015	E-test + Microdilución	bcn-hvh-030	Microdilución
bcn-hsp-029	Microdilución	bcn-hvh-031	Microdilución
bcn-hsp-016	E-test + Microdilución	bcn-hvh-033	Microdilución
bcn-hsp-027	Microdilución	bcn-hvh-034	Microdilución
bcn-hsp-011	E-test + Microdilución	bcn-hvh-035	Microdilución
bcn-hsp-012	E-test + Microdilución	bcn-hvh-036	Microdilución
bcn-hsp-014	E-test + Microdilución	bcn-hvh-037	Microdilución
bcn-hsp-019	E-test + Microdilución	bcn-hvh-038	Microdilución
bcn-hsp-021	E-test + Microdilución	bcn-hvh-039	Microdilución
bcn-hcl-001	E-test + Microdilución	bcn-hvh-040	Microdilución
bcn-hcl-002	E-test + Microdilución	bcn-hvh-041	Microdilución
bcn-hcl-003	E-test + Microdilución	bcn-hvh-042	Microdilución
bcn-hcl-004	E-test + Microdilución	bcn-hvh-043	Microdilución
bcn-hcl-005	E-test + Microdilución	bcn-hvh-045	Microdilución
bcn-hcl-006	E-test + Microdilución	bcn-hvh-046	Microdilución
bcn-hcl-007	E-test + Microdilución	bcn-hvh-047	Microdilución

Los protocolos utilizados para la elaboración de ambos métodos se encuentran detallados en el anexo VIII.

**Tabla 8.** Puntos de corte para las CMI's utilizados en el artículo de Biehl y *col.* 1995 [171].

Antimicrobial agent	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) for category:		
	Susceptible	Moderately susceptible	Resistant
Amikacin <sup>a</sup>	$\leq 16$	32	$> 32$
Cefoxitin <sup>a</sup>	$\leq 8$	16–32	$> 32$
Ciprofloxacin <sup>b</sup>	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Clarithromycin <sup>a</sup>	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Doxycycline <sup>a</sup>	$\leq 1$	2–8	$> 8$
Imipenem <sup>b</sup>	$\leq 4$	8	$\geq 16$

**Tabla 9.** Puntos de corte para el estudio de CMI de *M. abscessus* y *M. chelonae* utilizados en el estudio de Broda y col. 2013 [80].  
 Imagen tomada de Broda y col. 2013 [80].

Antimicrobial	MIC (µg/ml) for broth dilution			Broth dilution range (µg/ml)	Disc diffusion content (µg)
	Susceptible	Intermediate	Resistant		
AMI <sup>b</sup>	≤16	32	≥64	1–64	30
AUG2 <sup>c</sup>	≤8/4	16/8	≥32/16	2/1–64/32	NA
FEP <sup>c</sup>	≤8	16	≥32	1–32	NA
FOX <sup>b</sup>	≤16	32–64	≥128	4–128	30
AXO <sup>c</sup>	≤8	16–32	≥64	4–64	NA
CIP <sup>b</sup>	≤1	2	≥4	0.12–4	5
CLA <sup>b</sup>	≤2	4	≥8	0.06–16	15
DOX <sup>b</sup>	≤1	2–8	≥16	0.12–16	30
IMI <sup>b</sup>	≤4	8	≥16	2–64	10
LZD <sup>b</sup>	≤8	16	≥32	1–32	10
MIN <sup>c</sup>	≤1	2–4	≥8	1–8	30
MXF <sup>e</sup>	≤1	2	≥4	0.25–8	1
TGC <sup>d</sup>	NA	NA	NA	0.015–4	15
TOB <sup>b</sup>	≤4	8	≥16	1–4	10
SXT <sup>c</sup>	≤2/38	NA	≥4/76	0.25/4.75–8/152	NA

\* Las abreviaciones son: AMI, para ampicilina; AUG2, para augmentine; FEP, para cefepime; FOX, para cefoxitina; AXO, para ceftriaxona; CIP, para ciprofloxacina; CLA, para claritromicina; DOX, para doxiciclina; IMI, para imipenem; LZD, para linezolid; MIN, para minociclina; MXF, para moxifloxacina; TGC, para tigeciclina; TOB, para tobramicina; SXT, para trimetoprim-sulfametoxazol; y NA, para no disponible.

## 4.15. Evaluando las bases genéticas de la resistencia

### 4.15.1. Macrólidos

Los genes estudiados para evaluar la base genética de la resistencia a macrólidos en el complejo *M. abscessus* fueron los genes descritos en la bibliografía *rrl* y *erm(41)* [79,85,86,172-174]. Una vez obtenidas las secuencias de estos genes se buscaron los polimorfismos nucleotídicos simples o SNP (de sus siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphism) en las posiciones 2058 y 2059 del gen *rrl* y el SNP de T por C en la posición 28 del gen *erm(41)*, así como la delección parcial del gen.

En la tabla 10 se muestran los iniciadores utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación de los genes *rrl* y *erm(41)*.

**Tabla 10.** Genes asociados a la resistencia a los macrólidos en el complejo *M. abscessus*.

Gen	Iniciadores	Secuencia	Función	Longitud (pb)	Referencia
<i>erm(41)</i>	erm41F	GACCGGGCCTTCTTCGTGAT	Metiltransferasa de resistencia a la eritromicina	673	Bastian y col. 2011
	erm41R	GACTTCCCCGCACCGATTCC			
<i>rrl</i>	19F	GTAGCGAAATTCCTTGTCGG	Región rrl del ARN ribosomal del 23S	836	Bastian y col. 2011
	23R	TTCCCGCTTAGATGCTTTCAG			

## 4.15.2. Aminoglucósidos

Los genes estudiados para acercarnos a las bases genéticas de la resistencia frente a los aminoglucósidos fueron el gen *rrs*, *rpsL* y el *aac2'*. Para el gen *rrs* utilizamos los iniciadores descritos por Nessar y *col.* en el 2011 [93], mientras que para los otros dos genes diseñamos iniciadores específicos utilizando las secuencias de los genes descritos en el genoma de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977 (Número de acceso en el GenBank CU458896.1), y el programa Primer 3 [162].

Las secuencias de los iniciadores se muestra en la tabla 8 a continuación:

**Tabla 11.** Genes asociados a la resistencia de los aminoglucósidos en el complejo *M. abscessus*.

Gen	Iniciadores	Secuencia	Función	Longitud (pb)	Referencia
<i>rrs</i>	rrs1-F	ATGACGTCAAGTCATCATGCC	Región <i>rrs</i> del ARN ribosomal del 16S	350	Nessar y <i>col.</i> 2011
	rrs1-R	AGGTGATCCAGCCGCACCTTC			
<i>aac(2')</i>	AAC2'-F	GGTCAAGACCCCGTATGAAT	Región externa de la Acetilaminotransferasa 2'	629	Este estudio
	AAC2'-R	GGTGATTGGGTCTTCTTGC			
<i>rpsL</i>	rpsL-F	GCTGGTAGGCGAGTTGTCT	Proteína ribosomal S12 de la subunidad 30S	611	Este estudio
	rpsL-R	CTGCGGTTCTTGACTCCCT			

Los genes *aac(2')* y *rpsL* fueron traducidos a proteína y comparados con los genes de la secuencia de referencia ATCC.

## 4.15.3. Fluoroquinolonas

Los genes analizados para estudiar la base genética de la resistencia a las fluoroquinolonas fueron los genes *gyrA* y *gyrB*. Para estudiar la posible resistencia adquirida en la región QRDR de los genes *gyrA* y *gyrB* tradujimos las secuencias nucleotídicas obtenidas utilizando como molde la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia ATCC19977.

Comparamos las secuencias de aminoácidos obtenidas creando un alineamiento con la herramienta de alineamientos múltiples Clustal Omega (EMBL-EBI disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y con el software BioNumerics (AppliedMaths, disponible en <http://www.applied-maths.com/>).

**Tabla 12.** Genes asociados a la resistencia de la quinolonas en el complejo *M. abscessus*.

Gen	Iniciadores	Secuencia	Función	Longitud (pb)	Referencia
<i>gyrA</i>	GyrA-F	GGGCATCTAAAGCCGCTGAGA	Subunidad alfa de la girasa	1420	Lee y col. 2014
	GyrA-R	GACGATGGCCGCGCTGACGT			
<i>gyrB</i>	GyrB-F	GCAGATGCTAAAACGGTTGTGA	Subunidad beta de la girasa	910	Lee y col. 2014
	GyrB-R	CTCGTAAGTACGACGGCACAA			

#### 4.15.4. Oxazolidinonas

Los genes estudiados para estudiar la base genética de la resistencia a las oxazolidinonas, concretamente al linezolid fueron los genes *rrl*, *rplC* y *rplD*. Para el estudio del gen *rrl* se utilizaron los mismos iniciadores que para estudiar la mutación que afecta a la resistencia a los macrólidos descrito por Bastian y col. en 2011 [125,172], mientras que para el estudio de las proteínas L3 y L4 codificadas por los genes *rplC* y *rplD*, respectivamente, se diseñaron iniciadores específicos para éstos mediante el software Primer 3 [162] utilizando la secuencia de los genes presente en el genoma de referencia de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977.

**Tabla 13.** Genes asociados a la resistencia del linezolid en el complejo *M. abscessus*.

Gen	Iniciadores	Secuencia	Función	Longitud (pb)	Referencia
<i>rrl</i>	19F	GTAGCGAAATTCCTTGTCGG	Región rrl del ARN ribosomal del 23S	836	Bastian y col. 2011
	23R	TTCCCGCTTAGATGCTTTCAG			
<i>rplC</i>	rplC-F	GATCGCTACCCATACGTCCG	Proteína ribosomal L3 de la subunidad 50S	439	Este estudio
	rplC-R	TGGGTATGACGCAGGTGTTTC			
<i>rplD</i>	rplD-F	CGCTGAACACAACGTCATCG	Proteína ribosomal L4 de la subunidad 50S	624	Este estudio
	rplD-R	GCTGTCAAGCAGGTGAGAA			

El gen *rpIV* también lo estudiamos, pero después de realizar la WGS de las cepas y ensamblar los genomas utilizando Unicycler [175] utilizamos el gen de *rpIV* del genoma del ATCC19977 para hacer un BLAST y extraer el gen de todas las muestras. Después los traducimos a proteínas y alineamos las secuencias para su comparación utilizando la herramienta web Clustal Omega (disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

## **4.16. Traducción a proteínas**

Todos los genes estudiados que dan lugar a proteínas (excluyendo los que codifican para ARN ribosomal) se tradujeron utilizando la herramienta web de acceso libre Expasy (disponible en <https://expasy.org/>), la herramienta web de acceso libre EMBOSS Transeq (disponible en [https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)) o el plugin de traducción de BioNumerics, según cada caso.

## **4.17. Epidemiología molecular del complejo *M. abscessus***

Para el estudio de la epidemiología molecular del complejo *M. abscessus* utilizamos 3 técnicas diferentes para tiparlas y compararlas con nuestras cepas y cepas de otras zonas geográficas.

### **4.17.1. Cálculo del índice de Simpson para el cálculo de la diversidad**

Para comparar la potencia de los marcadores utilizados calculamos el índice de diversidad de Simpson [176]. Para ello utilizamos la fórmula descrita:

$$D = \frac{\left( \sum n(n-1) \right)}{\left( N(N-1) \right)}$$

Dónde:

*N* es el total de clones presentes.

*n* es el número de representantes por clon.

### **4.17.2. Variable Number of Tandem Repeats**

Para el estudio de filogenia por VNTR utilizamos los alelos e iniciadores utilizados por Wong y *col.* en 2012 [143]. Los protocolos de PCR y preparación de los fragmentos se encuentran detallados en el Anexo IX. En la tabla 14 se detallan las secuencias, marcajes de los iniciadores y la longitud del fragmento repetido.

**Tabla 14.** Alelos utilizados en la técnica de VNTR para el complejo *M. abscessus*.

Fragmento	Iniciadores	Secuencia	Fluorómetro	Repetición (pb)	Referencia
<b>TR 28</b>	TR28-F TR28-R	GAGACCGAACAACGACTGCT CCGGTAATGAATTGGGTTGA	VIC	27	Wong y col. 2012
<b>TR 45</b>	TR45-F TR45-R	CGAACTGCCTCGTGATCG CACTCTCCTGACGCCAGAC	FAM	32	Wong y col. 2012
<b>TR 86</b>	TR86-F TR86-R	GCGCGTATCTTGAACCAATC GGCGTACTCGTCGTAAGG	FAM	33	Wong y col. 2012
<b>TR 101</b>	TR101-F TR101-R	CCAGTGAACGACGCGATAC ACAGCTTCAGTTGGCATGTG	FAM	33	Wong y col. 2012
<b>TR 109</b>	TR109-F TR109-R	GCGTGTGGGCATATCAATTA CAATCTCGAGGTGGATGTGA	VIC	32	Wong y col. 2012
<b>TR 116</b>	TR116-F TR116-R	GAACACCTCAACCGCAGTG ATTAGCGGATAGGCTCACC	NED	33	Wong y col. 2012
<b>TR 131</b>	TR131-F TR131-R	CGACAAAGCCTGGAAGGAC AGGCATCCAGATCCACTGAT	FAM	30	Wong y col. 2012
<b>TR 137</b>	TR137-F TR137-R	ACAAGGTGGTGGTGCAGTC GGGGAGGTCAAAGAAAGAGG	VIC	33	Wong y col. 2012
<b>TR 139</b>	TR139-F TR139-R	ATCTCGAGCAGACCAGCATC GTCAACTGGATCCGGAGAAA	NED	32	Wong y col. 2012
<b>TR 149</b>	TR149-F TR149-R	CTTCGGTCATCAAACAGCTTC AGGGTGACCTGTGCGATATG	NED	33	Wong y col. 2012
<b>TR 150</b>	TR150-F TR150-R	ACGTGGCATCTCGATTGG TCCCACGAGACCATCAGAAT	FAM	30	Wong y col. 2012
<b>TR 155</b>	TR155-F TR155-R	CAACGTGGAATCTCAATACGC CCCTGAACAATTCGAGGAA	VIC	31	Wong y col. 2012
<b>TR 163</b>	TR163-F TR163-R	AGGGCAAGGTTGTGCACTC GCGAAGTCCTCGGCACTC	FAM	30	Wong y col. 2012
<b>TR 167</b>	TR167-F TR167-R	CGGTCTGTCACGATTACCAG GAATAGAGCGTCTGGTGGGA	VIC	33	Wong y col. 2012
<b>TR 172</b>	TR172-F TR172-R	CGTGTAGTCGCTTTGTGCTC ACTAACCATCCCCACGAC	NED	30	Wong y col. 2012
<b>TR 179</b>	TR179-F TR179-R	CCGAACGGTATAGGAGGTCA TTCGTCATCAACGTGGTCAT	FAM	33	Wong y col. 2012
<b>TR 200</b>	TR200-F TR200-R	ACATGACACGAACCCTCTGG GCTATCTGGTGGAGCATGGT	VIC	27	Wong y col. 2012

Los amplicones de PCR fueron analizados en el sistema de electroforesis capilar EPOCH (BioTek, Alemania). Los resultados se analizaron utilizando el programa BioNumerics v7.6 (AppliedMaths disponible en <http://www.applied-maths.com>).

### 4.17.2.1. Generación *in silico* de perfiles de VNTR de genomas públicos

Para incrementar el número de perfiles de VNTR generamos perfiles *in silico* de VNTR utilizando 37 genomas públicos de *M. abscessus* accesibles en el GenBank. Los genomas utilizados así como sus números de acceso están recogidos en la tabla 15.

**Tabla 15.** Genomas públicos del complejo *M. abscessus* y sus números de acceso en el GenBank.

Genoma	Número de acceso	Genoma	Número de acceso
ATCC19977	CU458896.1	strain PAP089	CSWK01000000.1
M93	AJGF01000000.1	strain 1044	FSKK01000000.1
MAB_082312_2258	AYTA01000000.1	V06705	AUMY01000000.1
MAB_091912_2446	AYTF01000000.1	CIP108541	JRMF01000000.1
MAB_2b_0107	AKUN01000000.1	M24	AJLY02000000.1
3A 0119 R	AKUX01000000.1	MM1513	NZ_CP009447.1
4S 0116 R	AKVE01000000.1	1S-151-0930	AKUI01000000.1
6G 0125 R	AKUE01000000.1	5S-0817	AKUB01000000.1
9808	AUMY01000000.1	Asan 50594	NC_021282.1
CF	CAHZ01000000.1	CCUG 48898	NZ_AP014547.1
DJO-44274	NZ_CP009615.1	CRM 0020	ATFQ01000000.1
Flac046	NZ_CP016192.1	GO 06	NC_018150.2
M139	AKVR01000000.1	M115	AJLZ00000000.1
M152	AKVT01000000.1	M148	AKVV01000000.1
M94	AJGG01000000.1	M154	AJMA01000000.1
strain 137	JRME01000000.1	M156	AKVU01000000.1
strain 23	JRMD01000000.1	M172	AJSE01000000.1
strain 4529	CP009616.1	M18	AJSC01000000.1
strain 54	NZ_FSGU00000000.1		

Para la obtención de los perfiles obtuvimos la secuencia que amplifican los iniciadores para cada locus del genoma de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977. Con esas secuencias hicimos un BLAST (NCBI) para cada locus en cada genoma público. La intención es obtener la longitud en pb de iniciador a iniciador. Con ese número utilizamos la tabla detallada en el anexo IX C para asignar el número de repeticiones a cada locus. En la tabla se muestran las longitudes teóricas de amplificación que corresponden a cada número de repeticiones.

El análisis de MaVa se realizó (*Multi allele Variable Number of Tandem Repeats Analysis*) tal y como está descrito en la literatura [144].

#### **4.17.2.2. MultiLocus Sequence Typing**

Para el estudio de filogenia del complejo *M. abscessus* por MLST utilizamos los alelos y los iniciadores descritos en la página web del Institute Pasteur (<http://bigsd.b.pasteur.fr/mycoabscessus/mycoabscessus.html>) y descritos por Macheras y col. en 2014 [146]. Los protocolos para la PCR y secuenciación se encuentran en los anexos IV y X. En la tabla 16 se detallan las secuencias de los iniciadores, la longitud esperada de los fragmentos, así como la función y el nombre de ellos genes estudiados.

**Tabla 16.** Genes utilizados en el análisis de MLST en el complejo *M. abscessus*.

Gen	Iniciadores	Secuencia	Función	Longitud (pb)	Referencia
<i>argH</i>	argH-F argH-R	GACGAGGGCGACAGCTTC GTGCGCGAGCAGATGATG	Liasa del argininosuccinato	480	Macheras y col. 2014
<i>cya</i>	cya-F cya-R	TAAGGGTGATGACGTGCTGT GTGAACGGCAACGCCTAC	Ciclasa adenilato	510	Macheras y col. 2014
<i>glpK</i>	glpK-F glpK-R	AATCTCACCGCGGTGTC GGACAGACCCACGATGGC	Glicerol quinasa	534	Macheras y col. 2014
<i>gnd</i>	gnd-F gnd-R	GTGACCTCGGAGTGGTTGG CTTCGCCTCAGGTCAGCTC	6-fosfogluconato deshidrogenasa	480	Macheras y col. 2014
<i>pta</i>	pta-F pta-R	GATCGGGCGTCATGCCT ACGAGGCACTGCTCTCCC	Fosfato acetiltransferasa	486	Macheras y col. 2014
<i>purH</i>	purH-F purH-R	CGGAGGCTTCACCTGGA CAGGCCACCGCTGATCTG	Subunidad fosforibosilaminoimidazolcarboxilasa de la ATPasa	549	Macheras y col. 2014
<i>murC</i>	murC-SF1 murC-SFR2	CGGACGAAAGCGACGGCT CCAAAACCTGCTGAGCC	Ligasa de UDP N-acetilmuramato-L-Ala	537	Macheras y col. 2014

Los resultados de la secuenciación de estos genes y el análisis de los perfiles obtenidos se analizaron utilizando el programa BioNumerics v7.6 (AppliedMaths disponible en <http://www.applied-maths.com>).

#### **4.17.2.3. Whole Genome Sequencing**

Para el estudio filogenético por WGS utilizamos los datos producidos por el secuenciador NextSeq 550 como se describe en el apartado de identificación por WGS.

En este apartado utilizamos los datos de WGS de las 36 cepas de Barcelona de 33 pacientes, junto con los datos de 10840 cepas de 32 pacientes del Great Ormond Street Hospital.

Además, inferimos subárboles separados para las secuencias de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, como también para las secuencias de los clusters ST-1 y ST-26 de *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Todas las secuencias incluidas en estos subárboles fueron mapeadas a una secuencia de referencia adecuada. Para el subárbol de *M. abscessus* subsp. *massiliense* utilizamos la secuencia de referencia *M. abscessus* subsp. *massiliense* GO 06 (disponible en GenBank). Para el subárbol de las cepas del ST-26 utilizamos el ensamblaje *de novo* de la primera secuencia aislada en este estudio (Idn\_gos\_2\_520). Mientras que para estudiar el cluster de cepas ST-1 pudimos utilizar

la secuencia de referencia de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 (disponible en el GenBank), ya que esta secuencia de referencia tiene el mismo ST que el conjunto de nuestras cepas ST-1. Todos los subárboles se generaron utilizando el método descrito en el Anexo VII, a excepción del subárbol del ST-26, que no se pudo aplicar el programa Gubbins pero las variantes se filtraron si 3 SNVs (*Single Nucleotide Variants*) se encontraron en una ventana de 100 pb.

#### **4.17.2.3.1. Análisis de los clusters obtenidos**

Los clusters obtenidos para inferir la posible transmisión se generaron utilizando 3 métodos distintos en cada subárbol. Primero, utilizamos un umbral de SNPs basado en la máxima diferencia de SNPs obtenida de las cepas de un mismo paciente a partir de la matriz de SNPs extraída del subárbol. Después asignamos clusters utilizando el paquete rPinecone del programa estadístico R. Este paquete incorpora umbrales de SNPs y distancias de la raíz a la punta que ah sido utilizado por otros autores cuando estudian poblaciones clonales [177]. Por último, también utilizamos el paquete de R hierBAPS [178] para asignar los clusters, aunque el hecho de que todas las secuencias de todas las muestras estuvieran incluidas en los clusters hizo que este análisis no fuera apropiado. Asumimos que todas las secuencias que pertenecen a pacientes diferentes incluidas dentro del mismo cluster pueden constituir una posible cadena de transmisión.

#### **4.17.2.3.2. Ensamblaje *de novo***

Todas las secuencias obtenidas por WGS fueron ensambladas *de novo* utilizando Iso programas SPAdes y pilon presentes dentro del

paquete Unicycler [175]. Los contigs ensamblados se anotaron con el programa prokka v1.13 [179] y la comparación del genoma accesorio se generó utilizando el programa roary v3.12.0 [180]. Después, generamos una lista de presencia/ausencia de genes para diferenciar los aislamientos. Los genes anotados se filtraron para eliminar secuencias codificantes (CDS, de sus siglas en inglés *Coding Determinant Sequences*) constituidas por más de 8000 pb o menos de 250, además de eliminar los genes presentes únicamente en 1 muestra o presentes en todas.



## **5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **5.1. Identificación de las subespecies del complejo de *M. abscessus***

### **5.1.1. Utilización de la WGS como técnica de referencia para la identificación.**

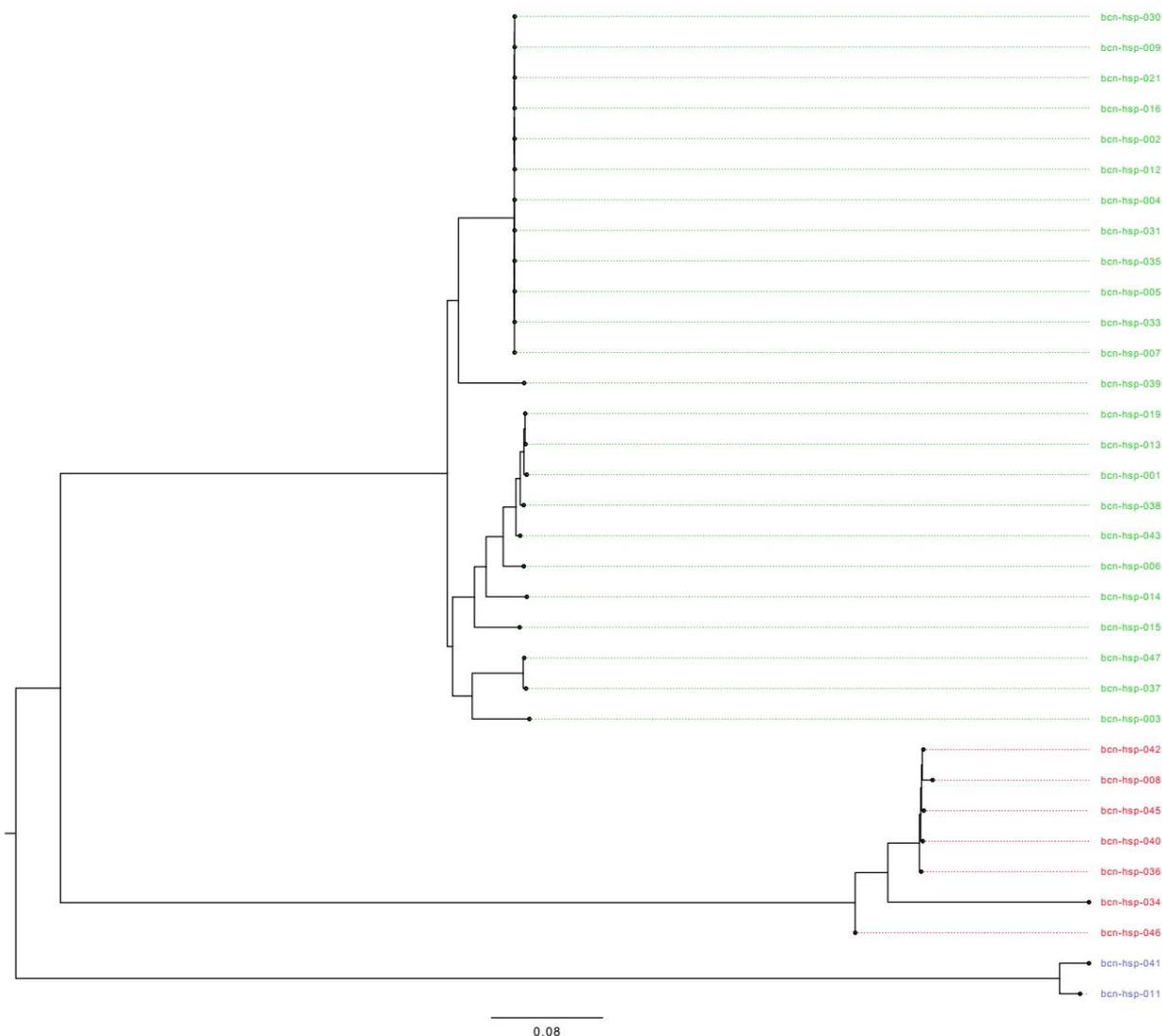
Para la identificación de las cepas del complejo *M. abscessus* hemos utilizado 33 primeros aislamientos de Barcelona de 3 hospitales diferentes aislados entre los años 2000 y 2015.

Treinta y tres aislamientos de Barcelona pertenecientes al complejo *M. abscessus* fueron separados perfectamente en las 3 subespecies del complejo en el árbol de SNPs creado con el algoritmo utilizando el software RAxML. En la figura 25 se pueden apreciar las 3 ramas que corresponden a la agrupación de cepas que pertenecen a *M. abscessus* subsp. *abscessus*, en la rama superior; cepas que corresponden a *M. abscessus* subsp. *bolletii*, en la rama inferior; y cepas correspondientes a *M. abscessus* subsp. *massiliense*, en la rama central. Las cepas que corresponden a *M. abscessus* subsp. *abscessus* las hemos coloreado en verde; las cepas correspondientes a *M. abscessus* subsp. *massiliense*, en rojo; y las cepas correspondientes a *M. abscessus* subsp. *bolletii*, en azul.

Veinticuatro de las 33 (72,7%) cepas fueron identificadas como *M. abscessus* subsp. *abscessus*, siete de las 33 (21,2%) cepas fueron identificadas como *M. abscessus* subsp. *massiliense*; y dos de las 33 (6,1%) cepas fueron identificadas como *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Estos resultados están acorde con otros trabajos realizados con WGS en el complejo de *M. abscessus* que lo dividen en 3 subespecies

[24,25,28,58,60,181]. En este sentido los resultados aquí mostrados están en la misma línea que los de otros autores [36,43,58,182].

**Figura 25.** Identificación de las cepas de *M. abscessus* por WGS.



Árbol de máxima verosimilitud creado a partir de las diferencias de SNPs de los *reads* mapeados a la cepa de referencia ATCC 19977 por RaxML. El color verde corresponde a cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, el color rojo corresponde a cepas pertenecientes a *M. abscessus* subsp. *massiliensey* el color azul corresponde a cepas pertenecientes a *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

La distribución de las subespecies del complejo *M. abscessus* coincide con la distribución que se encuentra en la bibliografía. En Estados Unidos, Europa y Japón la distribución de las subespecies del complejo es parecida: *M. abscessus* subsp. *abscessuses* la subespecie mayoritaria del complejo (57 - 78%), seguida por *M. abscessus* subsp. *massiliensei* (17 - 29%), y en último lugar la representación de *M. abscessus* subsp. *bolletii* (4 - 18%). En contraposición tenemos las publicaciones asiáticas de Korea y Malasia, y las publicaciones de Brasil en dónde *M. abscessus* subsp. *massiliense* tiene unos porcentajes mucho más elevados de representación. En el caso de los países asiáticos aunque la subespecie mayoritaria del complejo es *M. abscessus* subsp. *abscessus* (50 - 57%) llega a ser superada por *M. abscessus* subsp. *massiliense* en algunas publicaciones como en la de Yoshida y col. de 2015. Esta distribución debe matizarse en función de los cambios taxonómicos que ha sufrido el complejo. En el periodo 2011-2014 *M. abscessus* subsp. *massiliense* y *M. abscessus* subsp. *bolletii* estaban agrupados bajo la misma subespecie *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Así, la publicación del 2012 de de Moura y col. clasifican a los aislamientos como *M. abscessus* subsp. *bolletii* cuando son en realidad aislamientos de *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Por otra parte, brotes con gran número de cepas como el ocurrido en Brasil por *M. abscessus* subsp. *massiliense* pueden artefactuar de forma notable la distribución de las subespecies [31,163,174,183-186].

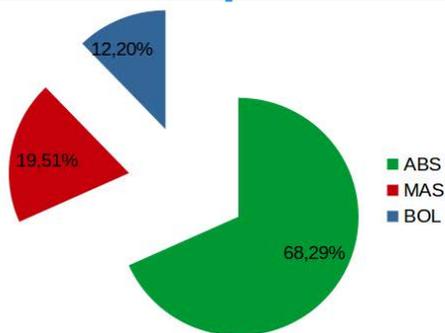
Tal como se ha comentado en la introducción, la taxonomía de *M. abscessus* ha sido cambiante. La WGS ha validado la

separación de la especie *M. abscessus* en tres subespecies (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* y *M. abscessus* subsp. *bolletii*) [24]. Esta división tiene todo el sentido clínico ya que permite orientar el tratamiento empírico de estas infecciones.

### **5.1.2. Identificación basada en secuenciación de múltiples genes**

Para la identificación de cepas del complejo de *M. abscessus* utilizamos el primer aislamiento de cada paciente. En total hemos identificado 33 cepas y 8 extractos de DNA guardados en la DNATECA procedentes de cepas no viables. Las cepas fueron aisladas en 3 hospitales de Barcelona. La distribución de las tres subespecies fue la siguiente: 28 *M. abscessus* subsp. *abscessus* (68%); 5 *M. abscessus* subsp. *bolletii* (12%); y 8 *M. abscessus* subsp. *massiliense* (20%). Los resultados de la homología de los 4 genes estructurales (*rpoB*, *hsp65*, *secA1* y *sodA*) se encuentran resumidos en la tabla 17 y la figura 26. En la tabla se muestran todos los aislamientos estudiados y el porcentaje de homología de cada gen con la secuencia correspondiente de la cepa de referencia de cada subespecie. Los porcentajes resaltados en negrita corresponden al gen con el que se ha obtenido la máxima homología entre los tres genes de referencia (uno por subespecie). Las abreviaturas ABS, BOL y MAS corresponden a *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* y *M. abscessus* subsp. *massiliense*, respectivamente.

**Figura 26.** Distribución de los aislamientos clínicos de *M. abscessus* en las 3 subespecies en Barcelona.



En 35 casos el porcentaje de similitud más elevado en los cuatro genes correspondía con los de la misma cepa de referencia, por lo que no había dudas sobre su identificación. En seis casos se observó máxima homología con genes de más de una subespecie. A estas cepas se les denomina cepas quiméricas. Las reglas de identificación sugieren que se adscriban a aquella subespecie con la que presentan más genes homólogos. La descripción de cepas con mayor homología a más de una subespecie concuerda con otras publicaciones [36,43,58,152,163,182,184]. De las 6 cepas quiméricas que encontramos, cinco pertenecen a la subespecie *M. abscessus* subsp. *massiliense* pero tienen un gen *rpoB* con un porcentaje de identidad superior cuando se compara contra el gen *rpoB* de *M. abscessus* subsp. *abscessus* que contra el de su subespecie. La otra cepa quimérica encontrada pertenece a la subespecie *M. abscessus* subsp. *abscessus* pero contiene un gen *secA* con un porcentaje de identidad más cercano a *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Kim y col. describieron la existencia de cepas pertenecientes a *M. abscessus* subsp.

*massiliense* con recombinación de genes *rpoB* de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, muy parecido a lo que nosotros hemos observado [182]. Por otro lado, en el primer trabajo que publicamos [187] encontramos una cepa de *M. abscessus* subsp. *massiliense* con un gen *erm(41)* completo con un porcentaje de identidad más cercano a *M. abscessus* subsp. *abscessus* que a *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Con nuestros resultados mostramos la presencia de genes de diferentes subespecies en el genoma de algunas cepas. Como nosotros hemos observado, y se ha descrito en la literatura [36,58,63], existe la transferencia horizontal de genes entre las subespecies del complejo *M. abscessus*. Está descrita la adquisición de genes de otras especies que comparten nicho ecológico con *M. abscessus*, de ahí la importancia de secuenciar más de un gen para la correcta clasificación de las cepas del complejo en sus subespecies [36]. En nuestro caso hemos observado la transferencia horizontal de genes en 6 de los 41 DNA estudiados, lo que representa un 15% de nuestros aislamientos.

Con los resultados aquí presentados, en nuestro caso, la identificación de las cepas del complejo *M. abscessus* utilizando el consenso de mayor porcentaje de similitud de 4 genes estructurales (*rpoB*, *hsp65*, *secA1* y *sodA*) da un resultado correcto validado por los resultados de WGS. La PCR-secuenciación de Sanger de estos 4 genes estructurales aquí utilizados es una técnica válida para la identificación a nivel de subespecie de las cepas del complejo *M. abscessus* en el laboratorio clínico de microbiología.

**Tabla 17 (Parte 1).** Identificación de las cepas del complejo *M. abscessus* por homología de genes estructurales.

Paciente	Muestra	Número de Cepa	Subespecies	Porcentaje de identidad				Identificación
				<i>rpoB</i>	<i>hsp65</i>	<i>secA1</i>	<i>sodA</i>	
1	Cepa	bcn-hsp-013	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	100	100	100	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,96	98,61	97,85	98,06	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,76	98,84	98,98	99,42	
2	Cepa	bcn-hsp-015	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,8	100	99,8	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	96,02	98,62	98,08	98,05	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,84	98,85	99,01	99,41	
3	Cepa	bcn-hsp-016	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	100	99,8	99,8	99,43	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,86	98,4	97,85	97,72	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,69	98,63	98,85	99,05	
4	ADN	04I462	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	95,82	98,86	97,95	98,07	BOL
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	99,44	99,8	99,8	99,8	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,18	99,54	98,63	98,46	
5	Cepa	bcn-hsp-011	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	95,96	98,63	97,77	96,1	BOL
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	99,86	100	99,8	100	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,6	99,54	98,23	98,29	
6	ADN	14I016	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	96,01	98,39	97,96	97,96	BOL
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	99,86	99,8	99,8	100	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,62	99,08	98,86	98,33	
7	ADN	07I004	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	95,75	98,6	98,02	98,64	BOL
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	99,45	100	100	99,79	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,27	99,3	98,71	98,46	
8	ADN	05I284	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	96,65	98,83	98,28	99,22	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	98,32	99,3	98,67	98,25	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	99,8	100	99,57	100	
9	Cepa	bcn-hsp-012	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	100	100	100	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,89	98,63	97,85	98,05	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,71	98,63	98,9	99,41	
10	ADN	10I050	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	100	99,8	100	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,89	98,4	97,85	98,06	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,52	98,63	98,98	99,42	
11	ADN	06I323	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	100	100	99,8	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,87	98,63	98,06	98,07	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,69	98,86	99,18	99,42	
12	ADN	09I456	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	100	99,8	100	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,87	98,4	97,85	98,06	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,7	98,64	98,97	99,41	
13	Cepa	bcn-hsp-014	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,8	100	99,8	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,72	98,63	97,85	98,06	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,55	98,87	98,8	99,42	
14	Cepa	bcn-hsp-019	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	100	99,8	99,8	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,87	98,41	97,85	98,14	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,69	98,63	98,83	99,44	
15	ADN	14I069	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,8	99,8	100	99,62	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,74	98,41	97,85	97,95	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,57	98,63	99,01	99,25	
16	Cepa	bcn-hsp-021	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,85	99,8	99,8	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,94	98,4	98,06	98,06	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,78	98,63	99,18	99,41	
17	Cepa	bcn-hcl-001	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,85	100	100	99,62	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,59	98,55	97,85	97,96	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,44	98,79	98,98	99,25	
18	Cepa	bcn-hcl-002	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,58	100	99,8	99,62	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,48	98,6	98,06	97,96	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,3	98,83	98,98	99,25	
19	Cepa	bcn-hcl-003	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99	100	97,96	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	94,84	98,63	99,8	98,15	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	95,65	98,86	98,14	99,44	
20	Cepa	bcn-hcl-004	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,8	99,54	100	99,62	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,75	98,19	97,85	97,96	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,58	98,41	99	99,25	
21	Cepa	bcn-hcl-005	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	99,72	99,8	100	99,8	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,63	98,38	97,85	97,37	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,45	98,61	99	98,68	

\* Las abreviaciones son: ABS, para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; y MAS, para *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

**Tabla 17 (Parte 2).** Identificación de las cepas del complejo *M. abscessus* por homología de genes estructurales.

Paciente	Muestra	Número de Cepa	Subespecies	Porcentaje de identidad				Identificación
				<i>rpoB</i>	<i>hsp65</i>	<i>secA1</i>	<i>sodA</i>	
22	Cepa	bcn-hcl-006	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,75	98,58	98,06	98,11	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,58	98,82	99	99,43	
23	Cepa	bcn-hcl-007	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,33</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>99,62</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,33	98,36	97,85	97,23	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,13	98,59	99	98,52	
24	Cepa	bcn-hcl-008	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	96,6	98,63	98,95	99,24	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	98,36	99,1	98,49	98,29	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	<b>99,58</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>	
25	Cepa	bcn-hcl-009	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,72</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,44</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,68	98,6	97,85	97,78	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,49	98,83	99	99,07	
26	Cepa	bcn-hvh-030	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,61</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,85	98,55	97,85	98,06	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,68	98,79	98,97	99,41	
27	Cepa	bcn-hvh-031	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,62</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,86	98,55	97,85	97,96	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,69	98,79	98,97	99,25	
28	Cepa	bcn-hvh-033	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,58</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,46	98,56	99,02	97,86	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,28	98,8	97,85	99,41	
29	Cepa	bcn-hvh-034	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	96,61	98,8	98,55	99,22	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	98,44	99,28	98,71	98,25	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	<b>99,71</b>	<b>100</b>	<b>99,79</b>	<b>100</b>	
30	Cepa	bcn-hvh-035	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,86</b>	<b>100</b>	<b>99,79</b>	<b>99,8</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,71	98,56	97,85	98,04	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,54	98,8	98,97	99,41	
31	Cepa	bcn-hvh-036	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,32</b>	98,6	98,95	99,54	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	96,27	99,06	98,49	98,24	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	97,37	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	
32	Cepa	bcn-hvh-037	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,6</b>	<b>99,8</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,87	98,32	97,85	98,05	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,69	98,8	98,8	99,41	
33	Cepa	bcn-hvh-038	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,86</b>	<b>100</b>	<b>99,79</b>	<b>99,8</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,71	98,32	97,85	98,05	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,54	98,8	98,97	99,41	
34	Cepa	bcn-hvh-039	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,93</b>	<b>100</b>	<b>99,67</b>	<b>99,62</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	97,89	98,63	98,06	97,29	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,09	98,64	98,57	99,25	
35	Cepa	bcn-hvh-040	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,3</b>	98,77	98,77	99,21	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	96,27	99,26	98,49	98,23	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	97,37	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	
36	Cepa	bcn-hvh-041	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	96,04	98,35	97,94	97,31	BOL
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<b>99,86</b>	<b>99,76</b>	<b>99,78</b>	<b>100</b>	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,63	99,29	98,76	98,23	
37	Cepa	bcn-hvh-042	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,31</b>	98,8	98,96	99,21	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	96,31	99,28	98,49	98,23	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	97,4	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	
38	Cepa	bcn-hvh-043	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,59</b>	<b>99,8</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	95,85	98,57	98,06	98,04	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	96,69	98,8	99,18	99,41	
39	Cepa	bcn-hvh-045	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,31</b>	99,18	98,57	99,39	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	97,24	99,32	98,49	98,14	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,03	<b>99,77</b>	<b>100</b>	<b>99,81</b>	
40	Cepa	bcn-hvh-046	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>99,66</b>	99,18	98,39	99,5	MAS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	97,83	99,31	98,49	98,14	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	98,43	<b>99,77</b>	<b>99,87</b>	<b>99,81</b>	
41	Cepa	bcn-hvh-047	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	ABS
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	96,7	98,57	97,85	98,03	
			<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	95,87	98,81	99	99,41	

\* Las abreviaciones son: ABS, para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; y MAS, para *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

### 5.1.3. Identificación basada en MALDI-TOF

La identificación de bacterias por MALDI-TOF es una técnica innovadora fácil de utilizar, precisa, y coste-efectiva. La técnica d identificación por MALDI-TOF ha revolucionado la identificación de las bacterias en los laboratorios clínicos de todo el mundo. La capacidad de poder dar resultados de identificación a nivel de especie en unos minutos ha contribuido a la integración del MALDI-TOF en los laboratorios clínicos de rutina. La identificación microbiológica por MALDI-TOF ha sustituido técnicas tradicionales como los tests bioquímicos y técnicas moleculares para identificar ciertas bacterias [188].

Tal y como se comenta en el apartado de material y métodos, la identificación de nuestras cepas por espectrometría de masas se realizó en el laboratorio de microbiología de la Mayo Clinic (Dra Wengenack). El protocolo para las resiembras y extracción proteica fue el propio de este servicio. Cabe destacar que la ruptura de la pared se realizó mecánicamente utilizando perlas de sílice. Los patrones obtenidos fueron comparados con la base de datos propia existente en el Servicio de Microbiología de la Mayo Clinic.

Todas las cepas fueron identificadas correctamente como miembros del complejo *M. abscessus*. Dieciocho de las veintisiete cepas (67%) fueron identificadas correctamente a nivel de subespecie teniendo en cuenta la primera opción presentada por el software de análisis. En cinco de las veintisiete cepas (18%) la identificación correcta correspondía

a la segunda opción. Finalmente, en cuatro de las veintisiete cepas (15%) la subespecie atribuida no era la correcta.

Es decir, en nuestra experiencia, la espectrometría de masas no consigue una buena identificación en el 33% de las cepas estudiadas. La tabla 18 muestra los resultados del análisis de las 27 muestras.

La identificación a nivel de subespecie en el complejo *M. abscessus* es imprescindible, como ya se ha comentado a lo largo de esta tesis, para poder enfocar mejor el tratamiento. El complejo *M. abscessus* es extraordinariamente resistente a los antimicrobianos, pero cada subespecie muestra variaciones en la sensibilidad. Careciendo las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, normalmente, de un gen *erm(41)* funcional y las cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* presentando, al contrario, siempre un gen *erm(41)* funcional, variando así la sensibilidad a la claritromicina.

**Tabla 18.** Identificación de 27 cepas de *M. abscessus* de Barcelona mediante MALDI-ToF.

Número de Cepa	Identificación por secuenciación	Resultados de Mayo Clinic MALDI			
		Organismo (Best Match)	Score Value	Organismo (2nd Best Match)	Score Value
bcn-hcl-002	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,14	ABS	1,93
bcn-hcl-004	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,18	ABS	2,1
bcn-hcl-008	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	BOL	2,14	<b>MAS</b>	2,1
bcn-hcl-009	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,18	ABS	2,18
bcn-hsp-011	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	ABS	2,14	ABS	2,02
bcn-hsp-012	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	MAS	2,21	<b>ABS</b>	2,2
bcn-hsp-013	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,17	ABS	2,01
bcn-hsp-014	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,14	ABS	2,13
bcn-hsp-015	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,01	ABS	1,92
bcn-hsp-016	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,17	ABS	2,16
bcn-hsp-019	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,23	ABS	2,16
bcn-hvh-030	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,22	ABS	2,16
bcn-hvh-031	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,19	ABS	2,08
bcn-hvh-033	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,18	ABS	2,14
bcn-hvh-034	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	MAS	2,11	MAS	2,09
bcn-hvh-035	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,2	BOL	2,11
bcn-hvh-036	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	BOL	2,2	ABS	2,09
bcn-hvh-037	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,25	ABS	2,23
bcn-hvh-038	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,01	ABS	1,97
bcn-hvh-039	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,07	ABS	2
bcn-hvh-040	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	BOL	2,3	<b>MAS</b>	2,2
bcn-hvh-041	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	ABS	2,21	ABS	2,19
bcn-hvh-042	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	BOL	2,3	<b>MAS</b>	2,13
bcn-hvh-043	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,24	ABS	2,23
bcn-hvh-045	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	ABS	2,12	ABS	2,1
bcn-hvh-046	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	BOL	2,29	<b>MAS</b>	2,2
bcn-hvh-047	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ABS	2,33	ABS	2,21

La identificación por secuenciación es la obtenida por WGS. En negrita se indica la identificación correcta dada por el MALDI. Las cepas resaltadas en rojo son las cepas en donde la identificación obtenida por MALDI no es correcta.

\* Las abreviaciones son: ABS, para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; MAS, para *M. abscessus* subsp. *massiliense*; y BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

La técnica de MALDI-ToF se basa en el análisis de perfiles de proteínas. Esto supone que es necesaria la extracción de proteínas para poder crear esos perfiles. En las micobacterias es imprescindible romper la pared a fin de extraer las proteínas. En otras bacterias de interés clínico las técnicas de extracción no son requeridas. En las bacterias gramnegativas, como *E. coli* o el complejo de *Acinetobacter*, las muestras se colocan directamente en la matriz sobre el pocillo de la placa de MALDI y con la aplicación del láser se desintegran y se pueden obtener los perfiles proteicos. En bacterias grampositivas, como los Estafilococos o los Enterococos, las muestras suelen requerir un procedimiento de lisis previo. Las bacterias grampositivas tienen una pared más gruesa de peptidoglicano que las hace más resistentes a la lisis y son tratadas con lisostafina, lisozima u otras moléculas que rompan la pared. También son tratadas con procedimientos de lisis mecánica como vórtex o sonicación con perlas de sílice o vidrio. Las micobacterias poseen una pared muy resistente formada por ácidos micólicos, peptidoglicano y azúcares que forman un esqueleto complejo [189,190]. Esta complejidad requiere un procedimiento adicional de lisis para poder obtener los extractos proteicos, como pasa en las bacterias grampositivas. Los principales procedimientos de lisis de la pared de las micobacterias para obtener extractos de proteínas son la utilización de ácido fórmico al 70% junto con etanol y acetonitrilo, y la ruptura mecánica utilizando perlas de sílice [50]. En un estudio multicentrico europeo (14 laboratorios) en el que hemos participado, se analizaban 12 cepas de NTM

utilizando 3 técnicas de extracción diferentes. Se utilizó la técnica propuesta por Bruker, una técnica similar con un paso extra de ruptura mecánica utilizando vórtex y perlas de sílice, y finalmente, otra técnica similar pero añadiendo un paso extra de 15 minutos de sonicación. Los resultados recogidos en el estudio [191] muestran que el protocolo utilizando la sonicación permitió una mayor tasa de identificaciones correctas. Aunque los otros dos métodos también obtuvieron un número elevado de identificaciones de NTM correctas. Por lo que, se llegó a la conclusión que la mejor forma para extraer las proteínas en las micobacterias era el protocolo utilizando la sonicación [191].

Por otra parte, la rentabilidad de la identificación por MALDI-TOF depende fundamentalmente de la representatividad de la base de datos con la que se comparan los patrones obtenidos. Estas bases de datos pueden ser comerciales o propias.

Existen dos bases de datos comerciales que se utilizan actualmente: la base de datos de Bruker Daltonics (Mycobacteria Library v5.0) y la base de datos de BioMérieux (Saramais v4.12 RUO con la ampliación para micobacterias IVD v3.0). La última actualización de la base de datos de Bruker para micobacterias contiene 912 espectros de 159 especies diferentes de micobacterias, mientras que la última actualización de la base de datos de *BioMérieux* contiene 1286 espectros de 45 especies de micobacterias [52]. Ambos sistemas permiten la identificación de micobacterias utilizando algoritmos diferentes pero que se ha demostrado que funcionan de forma similar a las técnicas convencionales [52].

En el caso de la identificación a nivel de subespecie del complejo *M. abscessus* pasa lo mismo que con otros complejos como el de *M. tuberculosis*, los dos sistemas son capaces de diferenciarlo de otras micobacterias a nivel de complejo pero son incapaces de diferenciar entre subespecies utilizando las bases de datos comerciales [48,192,193].

Alternativamente, los perfiles obtenidos pueden ser comparados con bases de datos propias, como ha sido nuestro caso. A pesar de nuestros resultados, existen estudios utilizando bases de datos propias [51,194,195] en dónde son capaces de diferenciar entre las subespecies del complejo *M. abscessus*. La presencia de 3 picos en las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* en el estudio de Fangous y col. y los 5 picos que propone Suzuki y col. son capaces de diferenciar a nivel de subespecies. Además en el estudio de Teng y col. de 2013 que realizó un análisis de clusters a partir de los datos obtenidos por el *Biotyper System* (Bruker) los autores afirman que son capaces de diferenciar *M. abscessus* subsp. *abscessus* de *M. abscessus* subsp. *massiliense* [196].

Pero, aunque el MALDI-TOF es una técnica que ha demostrado su eficacia, en ocasiones es poco discriminativa siendo incapaz de diferenciar entre las especies o subespecies de determinados grupos que presentan patrones protéicos muy similares. Así, está técnica no permite diferenciar de momento los complejos de *M. tuberculosis* o *M. abscessus*, el grupo *Enterobacter cloacae*, o el grupo *Streptococcus mitis* (dentro del cual se encuentra el neumococo), entre otros.

En resumen, la WGS no es una técnica práctica para la identificación en el laboratorio clínico. Hemos visto como el MALDI-TOF no permite por el momento, diferenciar entre las tres subespecies. En nuestra experiencia, la amplificación y secuenciación de 4 genes estructurales permite identificar con precisión las cepas a nivel de subespecie. Por ello, en la actualidad sería el método recomendado para identificar el complejo *M. abscessus* a nivel de subespecie en el laboratorio de Microbiología Clínica. Queda por ver, como en el futuro se mejora la identificación mediante MALDI-ToF que se adapta mucho mejor al flujo de trabajo del laboratorio clínico.

## **5.2. Resistencia a los antibióticos en el complejo *M. abscessus***

### **5.2.1. Microdilución en caldo Müller-Hinton ajustado de cationes**

El complejo *M. abscessus* es particularmente resistente a los antibióticos y sus infecciones son difíciles de tratar medicamente por lo que algunos autores recomiendan incluso la extirpación quirúrgica de las lesiones [96].

No existen guías estandarizadas para el tratamiento de las infecciones por el complejo *M. abscessus*. En la introducción (página 70) se ha recogido una tabla en la que se resumen las diferentes pautas terapéuticas que se han utilizado.

El marco terapéutico de tratamiento de las infecciones de *M. abscessus* tiene como base el tratamiento con macrólidos. La claritromicina es el tratamiento de elección cuando el resultado de los test de sensibilidad antibiótica da CMI's sensibles a los 14 días de incubación. Como régimen estándar de tratamiento se utiliza una combinación de un macrólido con otro fármaco de administración endovenosa durante dos semanas seguido de varios meses de tratamiento oral con macrólidos [18].

Los antibióticos mayormente utilizados en combinación con la claritromicina son: los aminoglucósidos (amicacina), las fluoroquinolonas (moxifloxacina y ciprofloxacina), el imipenem y la tigeciclina [18,151,197].

Los resultados que se muestran a continuación de sensibilidad antibiótica se han obtenido mediante la microdilución utilizando un panel comercial (RAPMYCO de Sensititre) que

incluye los siguientes antibióticos : macrólidos (claritromicina), aminoglucósidos (tobramicina y ampicilina), quinolonas (moxifloxacina y ciprofloxacina), imipenem, tigeciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, betaláctamicos (augmentine y cefoxitina), cefalosporinas de 4ª generación (cefepime) y tetraciclinas (doxiciclina y minociclina). Los criterios de interpretación fueron los del CLSI.

**Tabla 19.** Resultados del test de susceptibilidad antibiótica.

n=33	Sensibles	Intermedias	Resistentes	Rango	CMI 50	CMI 90
<b>SXT</b>	2 (6%)	0 (-)	<b>31 (94%)</b>	2 - > 8	> 8/152	> 8/152
<b>LND</b>	12 (36%)	13 (40%)	<b>8 (24%)</b>	<1 - 32	16	32
<b>CIP</b>	4 (12%)	3 (9%)	<b>26 (79%)</b>	0,5 - > 4	> 4	> 4
<b>IMI</b>	6 (18%)	9 (27%)	<b>18 (55%)</b>	< 2 - > 64	16	> 64
<b>MXF</b>	0 (-)	2 (6%)	<b>31 (94%)</b>	2 - > 8	8	> 8
<b>FEP</b>	0 (-)	0 (-)	<b>33 (100%)</b>	32 - > 32	> 32	> 32
<b>FOX</b>	0 (-)	30 (91%)	<b>3 (9%)</b>	16 - > 128	32	64
<b>AUG</b>	0 (-)	0 (-)	<b>33 (100%)</b>	32 - > 64	> 64/32	> 64/32
<b>AMI</b>	28 (85%)	2 (6%)	<b>3 (9%)</b>	4 - > 64	8	32
<b>TOB</b>	18 (55%)	9 (27%)	<b>6 (18%)</b>	4 - > 16	8	8
<b>AXO</b>	0 (-)	0 (-)	<b>33 (100%)</b>	32 - > 64	> 64	> 64
<b>DOX</b>	0 (-)	0 (-)	<b>33 (100%)</b>	> 16	> 16	> 16
<b>MIN</b>	0 (-)	0 (-)	<b>33 (100%)</b>	8 - > 8	> 8	> 8
<b>TIG</b>	33 (100%)	0 (-)	<b>0 (-)</b>	0,03 - 1	0	1
<b>CLR*</b>	12 (36%)	0 (-)	<b>21 (64%)</b>	0,25 - > 16	> 16	> 16

\* Las abreviaciones son SXT, para trimetoprim-sulfametoxazol; LND, para linezolid; CIP, para ciprofloxacina; IMI, para imipenem; MXF, para moxifloxacina; FEP, para cefepime; FOX, para cefoxitina; AUG, para augmentine; AMI, para ampicilina; TOB, para tobramicina; AXO, para ceftriaxona; DOX, para doxiciclina; MIN, para minociclina; TIG, para tigeciclina; y CLR, para claritromicina.

Hemos realizado el test de susceptibilidad antibiótica en los 33 primeros aislamientos. El 36% de las cepas del complejo *M. abscessus* fueron sensibles a la claritromicina. El cien por cien de las cepas fue sensible a la tigeciclina. La ampicilina muestra

un alto porcentaje de cepas sensibles in vitro (85%). El 55% de las cepas fueron sensibles a la tobramicina. Únicamente 2 cepas (6%) fueron sensibles a trimetoprim-sulfametoxazol. Dos cepas fueron sensibles al moxifloxacino (6%). El 18% de las cepas fueron sensibles a la ciprofloxacina.

Finalmente, ninguna de las cepas fue sensible a cefoxitina, cefepime, augmentine, ceftriaxona, doxiciclina, ni minociclina.

Una vez mostrados los resultados del test de susceptibilidad del complejo *M. abscessus* hemos dividido los resultados por subespecies.

**Tabla 20.** Resultados del test de susceptibilidad antibiótica divididos por subespecies.

	Sensibles			Intermedias			Resistentes		
	ABS	MAS	BOL	ABS	MAS	BOL	ABS	MAS	BOL
SXT	2/24 (8,3%)	0/7 (-)	0/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	22/24 (91,7%)	7/7 (100%)	2/2
LND	9/24 (37,5%)	3/7 (42,85%)	0/2	10/24 (41,7%)	1/7 (14,3%)	2/2	5/24 (20,8%)	3/7 (42,85%)	0/2
CIP	2/24 (8,3%)	2/7 (28,6%)	0/2	3/24 (12,5%)	0/7 (-)	0/2	19/24 (79,2%)	5/7 (71,4%)	2/2
IMI	5/24 (20,8%)	1/7 (14,3%)	0/2	6/24 (25%)	2/7 (28,6%)	1/2	13/24 (54,2%)	4/7 (57,1%)	1/2
MXF	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	2/24 (8,3%)	1/7 (14,3%)	0/2	22/24 (91,7%)	6/7 (85,7%)	2/2
FEP	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	24/24 (100%)	7/7 (100%)	2/2
FOX	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	21/24 (87,5%)	7/7 (100%)	2/2	3/24 (12,5%)	0/7 (-)	0/2
AUG	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	24/24 (100%)	7/7 (100%)	2/2
AMI	21/24 (87,5%)	5/7 (71,4%)	2/2	1/24 (4,2%)	1/7 (14,3%)	0/2	2/24 (8,3%)	1/7 (14,3%)	0/2
TOB	12/24 (50%)	4/7 (57,1%)	2/2	8/24 (33,3%)	1/7 (14,3%)	0/2	4/24 (16,7%)	2/7 (28,6%)	0/2
AXO	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	2/24 (8,3%)	0/7 (-)	0/2	22/24 (91,7%)	7/7 (100%)	2/2
DOX	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	24/24 (100%)	7/7 (100%)	2/2
MIN	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	24/24 (100%)	7/7 (100%)	2/2
TIG	24/24 (100%)	7/7 (100%)	2/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2
CLR*	6/24 (25%)	6/7 (85,7%)	0/2	0/24 (-)	0/7 (-)	0/2	18/24 (75%)	1/7 (14,3%)	2/2

Las abreviaciones son ABS, para *M. abscessus* subsp.*abscessus*; MAS, para *M. abscessus* subsp. *massiliense*; BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; SXT, para trimetoprim-sulfametoxazol; LND, para linezolid; CIP, para ciprofloxacino; IMI, para imipenem; MXF, para moxifloxacino; FEP, para cefepime; FOX, para cefoxitina; AUG, para augmentine; AMI, para amicacina; TOB, para tobramicina; AXO, para ceftriaxona; DOX, para doxiciclina; MIN, para minociclina; TIG, para tigeciclina; y CLR, para claritromicina.

En la tabla 20 observamos diferencias entre las 3 subespecies en la resistencia a algunos fármacos. Empezando por la claritromicina, se observa como todas las cepas excepto 1 de *M. abscessus* subsp. *massiliense* son sensibles; mientras que el 75% de las cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* son resistentes; y las 2 cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* son también resistentes. Las diferencias en la sensibilidad a la claritromicina de las 3 subespecies del complejo han sido extensamente descritas en la bibliografía [85,96] y se ajustan a los mecanismos moleculares que se describirán más adelante en esta tesis.

Los aminoglucósidos, después de los macrólidos, son los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones por *M. abscessus*. Analizando los resultados mostrados en la tabla 20, observamos como la mayor parte de las cepas de las 3 subespecies son sensibles a la amicacina con la excepción de 3 cepas (2 de ABS y 1 de MAS). En cuanto a la tobramicina, la distribución también es similar en las 3 subespecies, pero se observan más cepas resistentes comparando los resultados con los resultados de la amicacina.

Siguiendo con los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones de *M. abscessus* observamos un alto número de cepas resistentes a las quinolonas. Prácticamente todas las cepas son resistentes al moxifloxacino y únicamente 2 cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* y 2 cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* son sensibles al ciprofloxacino. No observamos diferencias destacables en la sensibilidad a las quinolonas entre las 3 subespecies del complejo.

Los resultados de la sensibilidad al linezolid muestran una distribución similar en las cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* y las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense*. En ambas subespecies se observan cepas sensibles, intermedias y resistentes con una distribución muy similar.

Cabe destacar el 100% de sensibilidad de todas las cepas a la tigeciclina. Finalmente, únicamente observamos 2 cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* sensibles al SXT, mientras que todas las demás cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *massiliense* son resistentes. La tabla 19 muestra como la distribución de la sensibilidad a los demás fármacos es similar para el complejo.

Al dividir los resultados por subespecie cabe destacar la diferencia de sensibilidad y resistencia para algunos antibióticos, destacable en el caso de la claritromicina, apoyando la importancia de la correcta identificación a nivel de subespecie como se comenta a lo largo de este trabajo. Cuando realizamos la comparación de la distribución de la resistencia de nuestras cepas con las publicadas por otros autores (como se muestra en la tabla 21) observamos similitudes y diferencias. El número de cepas resistentes a la claritromicina que nosotros observamos está de acuerdo con los demás autores.

**Tabla 21 (Parte 1).** Comparación de la epidemiología de la resistencia con otros estudios.

Resistencia		SXT	LND	CIP	IMI	MXF	FOX
Este estudio	Complex	31/33 (94%)	8/33 (24%)	26/33 (79%)	18/33 (55%)	31/33 (94%)	3/33 (9%)
	ABS	22/24 (91,7%)	5/24 (20,8%)	19/24 (79,2%)	13/24 (54,2%)	22/24 (91,7%)	3/24 (12,5%)
	MAS	7/7 (100%)	3/7 (42,85%)	5/7 (71,4%)	4/7 (57,1%)	6/7 (85,7%)	0/7 (-)
	BOL	2/2	0/2	2/2	1/2	2/2	0/2
Nessar 2012	Complex	73/74 (99%)	75/98 (77%)	42/74 (57%)	41/74 (55%)	6/21 (27%)	73/74 (99%)
		42/48 (88%)		21/48 (43%)	44/48 (92%)		43/48 (89%)
Broda 2013	Complex	53/58 (91%)	30/58 (52%)	55/58 (95%)	56/58 (97%)	55/58 (95%)	16/58 (28%)
Lee 2014	Complex			361/404 (89,4%)		319/404 (78,9%)	
	ABS			184/202 (91,1%)		167/202 (82,7%)	
	MAS			174/199 (87,4%)		149/199 (74,9%)	
	BOL			3/3 (100%)		3/3 (100%)	
Nie 2014	Complex		2/60 (3%)		7/60 (11,7%)	10/60 (16,7%)	1/60 (1,5%)
	ABS		1/45 (2%)		3/45 (7%)	4/45 (9%)	0/45 (-)
	MAS		1/25 (4%)		4/25 (16%)	6/25 (24%)	1/25 (4%)
Luo 2016	Complex	37/53 (69,8%)	11/53 (20,8%)		52/53 (98,1%)	51/53 (96,2%)	15/53 (28,3%)
	ABS	26/42 (61,9%)	10/42 (21,7%)		41/42 (97,6%)	40/42 (95,2%)	12/42 (28,6%)
	MAS	11/11 (100%)	1/11 (9,1%)		11/11 (100%)	11/11 (100%)	3/11 (27,3%)
Jeong 2017	Complex			20/20 (100%)	1/20 (10%)	17/20 (85%)	0/20 (-)
	ABS			10/10 (100%)	1/10 (10%)	9/10 (90%)	0/10 (-)
	MAS			10/10 (100%)	3/10 (30%)	8/10 (80%)	0/10 (-)
Sabin 2017	ABS	46%	4-9%	58-100%	10-44%	83-96%	3,6-32%
	MAS		2-6%	98%	17-66,7%	75-89%	87%
	BOL		4%	100%	16%	100%	4%
Li 2017	Complex	93/162 (57,4%)	73/162 (45,1%)		156/162 (96,3%)	160/162 (98,8%)	106/162 (65,4%)
	ABS	68/123 (55,3%)	58/123 (47,2%)		118/123 (95,9%)	122/123 (99,1%)	79/123 (64,2%)
	MAS	25/39 (64,1%)	15/39 (97,4%)		38/39 (97,4%)	38/39 (97,4%)	27/39 (69,2%)
Shen 2018	Complex	18/20 (90%)	3/20 (15%)	19/20 (95%)	13/20 (65%)	19/20 (95%)	2/20 (10%)

\* Las abreviaciones son ABS, para *M. abscessus* subsp.*abscessus*; MAS, para *M. abscessus* subsp. *massiliense*; BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; SXT, para trimetoprim-sulfametoxazol; LND, para linezolid; CIP, para ciprofloxacino; IMI, para imipenem; MXF, para moxifloxacino; FEP, para cefepime; y FOX, para cefoxitina.

**Tabla 21 (Parte 2).** Comparación de la epidemiología de la resistencia con otros estudios.

Resistencia		AMI	TOB	DOX	MIN	TIG	CLR*
Este estudio	Complex	3/33 (9%)	6/33 (18%)	33/33 (100%)	33/33 (100%)	0/33 (-)	21/33 (64%)
	ABS	2/24 (8,3%)	4/24 (16,7%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)	0/24 (-)	18/24 (75%)
	MAS	1/7 (14,3%)	2/7 (28,6%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0/7 (-)	1/7 (14,3%)
	BOL	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	2/2
Nessar 2012	Complex	3/48 (6%)		19/20 (95%)	19/20 (95%)		73/74 (99%)
		15/117 (13%)		44/48 (91,5%)			40/48 (17%)
Broda 2013	Complex	10/58 (17%)	53/58 (91%)	57/58 (98%)	58/58 (100%)		22/58 (38%)
Lee 2014	Complex	40/404 (9,9%)					186/404 (46%)
	ABS	25/202 (12,4%)					168/202 (83,2%)
	MAS	12/199 (6%)					15/199 (7,5%)
	BOL	3/3 (100%)					3/3 (100%)
Nie 2014	Complex	1/60 (1,5%)					38/60 (63,3%)
	ABS	0/45 (-)					37/45 (83%)
	MAS	1/25 (4%)					1/25 (4%)
Luo 2016	Complex	1/53 (1,9%)	44/53 (83%)	52/53 (98,1%)		0/53 (-)	36/53 (67%)
	ABS	1/42 (2,4%)	33/42 (78,6%)	41/42 (97,6%)		0/42 (-)	31/42 (73,8%)
	MAS	0/11 (-)	11/11 (100%)	11/11 (100%)		0/11 (-)	5/11 (45,5%)
Jeong 2017	Complex	2/20 (10%)		19/20 (95%)			8/20 (40%)
	ABS	1/10 (10%)		10/10 (100%)			8/10 (80%)
	MAS	1/10 (10%)		9/10 (90%)			0/10 (-)
Sabin 2017	ABS	1-14%	36%	100%		1%	31-80%
	MAS	2-10%		90%			0-10%
	BOL	100%					100%
Li 2017	Complex	3/162 (1,9%)	147/162 (90,7%)	161/162 (99,4%)			119/162 (73,6%)
	ABS	3/123 (2,4%)	109/123 (88,6%)	122/123 (99,1%)			108/123 (87,8%)
	MAS	0 (-)	38/39 (97,4%)	39 (100%)			11 (28,2%)
Shen 2018	Complex	2/20 (10%)	12/20 (60%)	14/20 (70%)	11/20 (55%)	9/20 (45%)	7/20 (35%)

\* Las abreviaciones son ABS, para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; MAS, para *M. abscessus* subsp. *massiliense*; BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; AUG, para augmentine; AMI, para amicacina; TOB, para tobramicina; AXO, para ceftriaxona; DOX, para doxiciclina; MIN, para minociclina; TIG, para tigeclina; y CLR, para claritromicina.

La baja resistencia a la amicacina que nosotros observamos en nuestras cepas está de acuerdo con todos los demás autores, con algunos matices a nivel de subespecies. Lee y col. encuentran que las 3 cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* estudiadas en su publicación del 2014 son resistentes a la amicacina, en contra de nuestras dos cepas que son sensibles [110]. La tobramicina, el otro aminoglucósido estudiado, muestra grandes diferencias con los demás autores. Nuestros resultados muestran el 18% de las cepas (6/33) resistentes a la

tobramicina, mientras que los demás autores tienen porcentajes que van desde el 60% al 91% de cepas resistentes. Un dato a tener en cuenta es que los resultados de algunos autores son de cepas de pacientes con fibrosis quística o pacientes en los que se sospechaba una infección previa [80,198-200]. La tobramicina es un antibiótico ampliamente utilizado para tratar infecciones en pacientes con fibrosis quística. El hecho de haber tratado infecciones anteriores por otras bacterias en estos pacientes con aminoglucósidos podría ser una explicación a los niveles de resistencia observados.

Nuestro resultado respecto al porcentaje de cepas resistentes al ciprofloxacino y moxifloxacino están de acuerdo con los resultados de otros autores [110,197,199-202]. Estos resultados remarcan un elevado número de cepas resistentes al ciprofloxacino y el moxifloxacino. Por contra, los resultados publicados por otros autores muestran un bajo porcentaje de cepas resistentes al moxifloxacino [79,201].

Nuestros resultados de resistencia al linezolid a nivel de complejo están de acuerdo con los resultados publicados por algunos autores con valores entre el 15 y el 20% [198,200]. Observamos que, respecto al linezolid, tenemos un porcentaje de cepas resistente inferior que otras publicaciones [79,80,199]. Y, por contra, tenemos unos resultados de resistencia ligeramente superiores a los que obtienen en otros estudios [201,202].

La resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol que observamos del 94% se encuentra de acuerdo con otras publicaciones [79,80,200]. Por contra, observamos valores de resistencia a

SXT superiores a los que han descrito otros autores [198,199,202].

La resistencia al imipenem se encuentra de acuerdo con la mayoría de publicaciones [79,197,200-202]. Estos autores encuentran un número similar al que nosotros hemos observado de cepas resistentes al imipenem. En cambio, nuestros resultados difieren con algunos estudios [80,198,199]. La resistencia que observamos en nuestros resultados a la cefoxitina es similar a las demás publicaciones [197,200-202]. Aunque existen estudios con un número superior de cepas resistentes a la cefoxitina [79,198,199].

El número de cepas resistentes a la doxiciclina y la minociclina están de acuerdo con los demás autores a excepción con los de datos de Shen y *col.* que observan un número inferior de cepas resistentes a estos fármacos [200].

Finalmente, los valores que mostramos de sensibilidad a la tigeciclina están de acuerdo con la literatura. Con la excepción de los valores que presentan Shen y *col.* que encuentran 9 cepas resistentes a la tigeciclina [200].

Así pues, los resultados observados están de acuerdo con los publicados en otras series. A pesar de ello, existe una variación en los porcentajes de resistencia a los distintos antibióticos que puede ser debida a problemas de reproducibilidad de la técnica o a diferencias en los perfiles de enfermos entre las series que justificaría estas diferencias en función de tratamientos anteriores.

En el anexo XII se muestran los resultados de CMIs de todas las cepas estudiadas.

## 5.2.2. Test de sensibilidad antibiótica E-test

El E-test se realizó en 17 de las 33 cepas para claritromicina, ciprofloxacino, imipenem, amicacina y estreptomicina. En la tabla 22 se muestran los resultados del E Test y en la tabla 23 la comparación del método E-test con el de microdilución utilizando los resultados de las mismas 17 cepas en las que disponíamos de los dos métodos.

**Tabla 22.** Resultados del test de sensibilidad antibiótica mediante E-test.

n=17	Sensibles	Intermedias	Resistentes	Rango	CMI 50	CMI 90
<b>CLR*</b>	4/17 (24%)	0 (-)	<b>13/17 (76%)</b>	0,25 - >256	>256	>256
<b>CIP</b>	1/17 (6%)	0 (-)	<b>16/17 (94%)</b>	0,5 - >32	>32	>32
<b>IMI</b>	0 (-)	0 (-)	<b>17/17 (100%)</b>	>32	>32	>32
<b>AMI</b>	6/17 (35%)	3/17 (17,5%)	<b>8/17 (47%)</b>	24 - >256	64	>256
<b>STR</b>	1/17 (6%)	1/17 (6%)	<b>15/17 (88%)</b>	8 - >1024	>1024	>1024

\* La lectura de la claritromicina mostrada es la de los 14 días.

\*\* Las abreviaciones son: CLR, para claritromicina; CIP, para ciprofloxacino; IMI, para imipenem; AMI, para amicacina; y STR, para estreptomicina.

Los resultados de sensibilidad mediante la técnica del E-test muestran unos porcentajes elevados de resistencia a la claritromicina, el ciprofloxacino, el imipenem la estreptomicina y la amicacina.

En la tabla 23 se puede observar diferencias entre ambas técnicas. Según el CLSI y la ATS/IDSA americanos, la técnica de elección para el test de susceptibilidad antibiótica para las RGM es la microdilución en caldo de Müller-Hinton [203,204]. Nuestros resultados muestran que la técnica de E-test da un porcentaje de resistencia a los fármacos estudiados más elevado que la microdilución. Además, se ha observado poca

reproducibilidad entre laboratorios al utilizar el E-test y una mayor reproducibilidad utilizando la microdilución [96,205].

**Tabla 23.** Comparación de las técnicas de estudio de sensibilidad antibiótica.

E-test	CLR	CIP	IMI	AMI
<b>Sensibles</b>	24%	6%		35%
<b>Intermedias</b>				18%
<b>Resistentes</b>	76%	94%	100%	47%
Microdilución	CLR	CIP	IMI	AMI
<b>Sensibles</b>	29%	6%	18%	100%
<b>Intermedias</b>		12%	29%	
<b>Resistentes</b>	71%	82%	53%	

\* Las abreviaciones son: CLR, para claritromicina; CIP, para ciprofloxacino; IMI, para imipenem; y AMI, para ampicilina.

En el libro publicado por Griffith [206], se sugiere que el motivo de la diferencia en la reproducibilidad de las dos técnicas puede ser porque la microdilución está muy bien estandarizada. Uno de los motivos que pueden explicar las diferencias entre ambas técnicas es la interpretación. En la microdilución, la interpretación es más fácil al comparar de forma visual un control positivo de la misma cepa que crece en un pocillo sin antibiótico con los demás. Mientras que en el E-test la interpretación se realiza observando el halo de inhibición que se forma en torno a la tira, que no siempre se ve nítido (existiendo el fenómeno de *trailing*, que es la observación de filamentos elípticos y difusos por un crecimiento desigual de algunas colonias) [96].

Griffith también destaca que aunque existen estudios que obtienen resultados similares al test de microdilución, el E-test

a veces utiliza puntos de corte extrapolados de estudios con *M. tuberculosis* en placas de agar. Además, el E-test está calibrado para interpretarlo a las 12-24h de cultivo. Una lectura tan temprana es imposible hasta para los crecedores más rápidos. Otro punto destacable es el crecimiento de las micobacterias en diferentes medios. En medio líquido, como Muller-Hinton suplementados con OADC o *Middlebrook*, es más fácil observar el crecimiento mientras que en medio sólido es más difícil [80,206].

### **5.2.3. Evaluando las bases genéticas de la resistencia antibiótica**

Hemos estudiado los mecanismos moleculares asociados a la resistencia inicial del complejo a los macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas y linezolid. Los genes de resistencia analizados son:

- Claritromicina: *erm(41)* y *rrl*.
- Aminoglucósidos: *rrs*, *aac2'-IId* y proteína ribosomal S12.
- Quinolonas: *gyrA* y *gyrB*.
- Linezolid: *rrl*, *rplC*, *rplD* y *rplV*.

Para ello hemos utilizado los datos de 33 cepas correspondientes a primeros aislamientos y 8 extracciones de ADN de primeros aislamientos adicionales en que únicamente pudimos estudiar los mecanismos moleculares de resistencia a los macrólidos. Los resultados se muestran en la tabla 24.

**Tabla 24.** Bases genéticas de la resistencia antibiótica inicial.

Paciente	Identificador	Subespecie	<i>erm(41)</i>	<i>rrl</i>	<i>rrs</i>	AAC(2) <sup>a</sup>	Proteína ribosomal S12 <sup>a</sup>	GYRA <sup>a</sup>	GYRB <sup>a</sup>	Proteína ribosomal L3 <sup>a</sup>	Proteína ribosomal L4 <sup>a</sup>	Proteína ribosomal L22 <sup>a</sup>
1	bcn-hsp-013	ABS	28C	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
2	bcn-hsp-015	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
3	bcn-hsp-016	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
4	041463 <sup>b</sup>	BOL	28T	wt								
5	bcn-hsp-011	BOL	28T	wt	wt	S2P, SSF, V85A, T107A	wt	wt	wt	wt	wt	wt
6	141016 <sup>b</sup>	BOL	28T	wt								
7	071004 <sup>b</sup>	BOL	Truncado	wt								
8	051284 <sup>b</sup>	MAS	Truncado	wt								
9	bcn-hsp-012	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
10	101050 <sup>b</sup>	ABS	28T	wt								
11	061323 <sup>b</sup>	ABS	28T	wt								
12	091456 <sup>b</sup>	ABS	28T	wt								
13	bcn-hsp-014	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
14	bcn-hsp-019	ABS	28C	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
15	141069 <sup>b</sup>	ABS	28C	wt								
16	bcn-hsp-021	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
17	bcn-hcl-001	ABS	28C	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
18	bcn-hcl-002	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
19	bcn-hcl-003	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
20	bcn-hcl-004	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
21	bcn-hcl-005	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
22	bcn-hcl-006	ABS	28C	wt	wt	wt	wt	S734T	wt	wt	wt	wt
23	bcn-hcl-007	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
24	bcn-hcl-008	MAS	Truncado	wt	wt	wt	wt	wt	S7N	wt	G142AC	wt
25	bcn-hcl-009	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
26	bcn-hvh-030	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
27	bcn-hvh-031	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
28	bcn-hvh-033	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
29	bcn-hvh-034	MAS	Truncado	wt	wt	V85A, S175T	wt	wt	S7N, T576S	wt	G142AC, A175P	wt
30	bcn-hvh-035	ABS	28T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
31	bcn-hvh-036	MAS	Truncado	A2059G	A1408G	V85A, S175T	wt	wt	wt	wt	G142AC	wt
32	bcn-hvh-037	ABS	28T	A2058C	wt	V85A, T107A	wt	wt	wt	wt	wt	wt
33	bcn-hvh-038	ABS	28C	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
34	bcn-hvh-039	ABS	28T	wt	A1408G	P159A	wt	wt	wt	wt	wt	wt
35	bcn-hvh-040	MAS	Truncado	wt	wt	V85A, S175T	wt	wt	S7N	wt	G142AC	wt
36	bcn-hvh-041	BOL	28T	wt	wt	S5F, V85A, T107A	wt	wt	wt	wt	wt	wt
37	bcn-hvh-042	MAS	Truncado	wt	wt	V85A, S175T	wt	wt	S7N	wt	G142AC	wt
38	bcn-hvh-043	ABS	28C	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
39	bcn-hvh-045	MAS	Truncado	wt	wt	V85A, S175T	wt	wt	wt	wt	G142AC	wt
40	bcn-hvh-046	MAS	Truncado	wt	wt	V85A, S175T	wt	wt	S7N	wt	G142AC	wt
41	bcn-hvh-047	ABS	28T	wt	wt	V85A, T107A	wt	wt	wt	wt	wt	wt

<sup>A</sup> Análisis de la traducción a proteína de la secuencia nucleotídica del gen.

<sup>B</sup> Cepas en las que únicamente se realizó el estudio de los genes *erm(41)* y *rrl*.

\* Las abreviaciones son: ABS para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; MAS para *M. abscessus* subsp. *massiliense*; BOL para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; y N/A para No Aplicable.

### 5.2.3.1. Macrólidos

Recuerdese (introducción página 38) los mecanismos de resistencia inducible y resistencia constitutiva presentes en los organismos del complejo *M. abscessus*. Brevemente, el mecanismo de resistencia inducible a los macrólidos viene determinado por la funcionalidad de la metiltransferasa codificada por el gen *erm(41)*. Para que la metiltransferasa sea funcional, el gen *erm(41)* tiene que estar completo y poseer el polimorfismo 28T (una timina en la posición 28 del gen). Existen 3 variaciones del gen *erm(41)* asociadas a la subespecie. Un gen *erm(41)* completo con el polimorfismo 28T que induce resistencia a los macrólidos presente en *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Un gen *erm(41)* completo pero con el polimorfismo 28C (no funcional, no induce resistencia) presente en *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Finalmente, la tercera variación del gen *erm(41)*, se corresponde con un gen truncado no funcional presente en *M. abscessus* subsp. *massiliense* [85-87].

Además, la resistencia constitutiva a los macrólidos se debe a la selección de mutaciones en las posiciones 2058 y 2059 del gen *rrl* [84,174].

Para determinar el mecanismo molecular asociado a la resistencia a los macrólidos en el complejo *M. abscessus* hemos estudiado la funcionalidad del gen *erm(41)* y la selección de mutaciones en el gen *rrl* de 33 cepas y 8 extracciones de ADN.

En la tabla 25 se recojen los resultados de CMI de la claritromicina junto con los resultados del análisis de PCR-secuenciación de los genes *erm(41)* y *rrl*.

#### **5.2.3.1.1. Resistencia inicial**

Veinticinco de cuarenta y una cepas muestran un genotipo de *erm(41)* con el polimorfismo 28T (gen *erm(41)* funcional). Las 25 cepas con el polimorfismo 28T corresponden a 21 cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* y 4 cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Todas las cepas con el polimorfismo 28T fueron resistentes a la claritromicina, después de la lectura del antibiograma a los 14 días. Además, la cepa bcn-hvh-037 también ha seleccionado una mutación en el gen *rrl*, observándose un cambio de A por C en la posición 2058.

Siete cepas de las cuarenta y una muestran el polimorfismo 28C en el gen *erm(41)* (gen *erm(41)* no funcional). Las 7 cepas fueron identificadas como *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Todas son sensibles a la claritromicina tras la lectura a los 14 días. Los genes *rrl* de todas estas cepas son salvajes (wt). Nueve de las cuarenta y una cepas muestran un genotipo de gen *erm(41)* truncado. De estas nueve cepas, ocho se corresponden con cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* y una corresponde a una cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* (071004). Seis cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* con resultados de CMI a la claritromicina muestran CMIs sensibles y una cepa (bcn-hvh-036) muestra una CMI resistente. En esta cepa observamos la selección de una mutación A2059G en el

gen *rrl*. Las demás cepas tienen un gen *rrl* salvaje, concordando con los valores de CMI a la claritromicina que muestran.

Nuestros resultados están de acuerdo con la bibliografía disponible hasta la fecha, en la que la resistencia a los macrólidos en el complejo *M. abscessus* se debe a la presencia del polimorfismo 28T en un gen *erm(41)* completo o a la adquisición de mutaciones en las posiciones 2058/2059 en el gen *rrl* [84,172,174].

En lo que corresponde a las bases genéticas de la resistencia a los macrólidos en el complejo *M. abscessus* hemos observado que la forma mayoritaria de resistencia a la claritromicina es debida a la presencia de un gen *erm(41)* funcional en las cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Todas las cepas estudiadas correspondientes a *M. abscessus* subsp. *massiliense* tenían las dos deleciones características del gen *erm(41)* de la subespecie.

No encontramos ningún *M. abscessus* subsp. *massiliense* con un gen *erm(41)* completo y funcional en nuestras cepas, en contraposición a Shallom y col. que encontraron dos cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* en 2013 con un gen *erm(41)* completo y funcional [207]. Teniendo en cuenta la publicación de Shallom y col. junto con las publicaciones de otros autores, la presencia de genes *erm(41)* completos en cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* y nuestro hallazgo de un gen *erm(41)* truncado en una cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, sugieren la transferencia horizontal de genes entre las subespecies del complejo creando cepas quiméricas [58,87].

De esta forma sugerimos que además de la correcta identificación de la subespecie, es imprescindible la secuenciación del gen *erm(41)* con tal de predecir la posible resistencia inducible a los macrólidos.

Nuestros resultados muestran dos cepas con mutaciones en el gen *rrl* correspondientes a un primer aislamiento de *M. abscessus* subsp. *massiliense* y un primer aislamiento de *M. abscessus* subsp. *abscessus* con un gen *erm(41)* funcional. Otros autores también han observado cepas de primeros aislamientos de *M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *massiliense* con mutaciones en el gen *rrl* [110,174].

Como era de esperar existe una correlación entre las bases genéticas de la resistencia a los macrólidos y las CMI's a la claritromicina. Nuestros resultados muestran que en las cepas con mutaciones en el gen *rrl*, se observan CMI's resistentes de alto nivel a los 3 días. Mientras que las cepas que tienen un gen *erm(41)* funcional la resistencia se observa los 14 días.

**Tabla 25.** Estudio del mecanismo molecular asociado a la resistencia de los macrólidos.

Paciente	Identificador	Subespecie	Claritromicina		<i>erm(41)</i>	<i>rrl</i>
			CMI	Resultado		
1	bcn-hsp-013	ABS	0,5	S	28C	wt
2	bcn-hsp-015	ABS	16	R	28T	wt
3	bcn-hsp-016	ABS	> 16	R	28T	wt
4	041462	BOL	N/D	N/D	28T	wt
5	bcn-hsp-011	BOL	> 16	R	28T	wt
6	141016	BOL	> 16	R	28T	wt
7	071004	BOL	N/D	N/D	Truncado	wt
8	051284	MAS	N/D	N/D	Truncado	wt
9	bcn-hsp-012	ABS	> 16	R	28T	wt
10	101050	ABS	N/D	N/D	28T	wt
11	061323	ABS	N/D	N/D	28T	wt
12	091456	ABS	N/D	N/D	28T	wt
13	bcn-hsp-014	ABS	> 16	R	28T	wt
14	bcn-hsp-019	ABS	0,5	S	28C	wt
15	141069	ABS	N/D	N/D	28C	wt
16	bcn-hsp-021	ABS	> 16	R	28T	wt
17	bcn-hcl-001	ABS	2	S	28C	wt
18	bcn-hcl-002	ABS	> 16	R	28T	wt
19	bcn-hcl-003	ABS	> 16	R	28T	wt
20	bcn-hcl-004	ABS	> 16	R	28T	wt
21	bcn-hcl-005	ABS	> 16	R	28T	wt
22	bcn-hcl-006	ABS	0,5	S	28C	wt
23	bcn-hcl-007	ABS	> 16	R	28T	wt
24	bcn-hcl-008	MAS	2	S	Truncado	wt
25	bcn-hcl-009	ABS	> 16	R	28T	wt
26	bcn-hvh-030	ABS	> 16	R	28T	wt
27	bcn-hvh-031	ABS	16	R	28T	wt
28	bcn-hvh-033	ABS	> 16	R	28T	wt
29	bcn-hvh-034	MAS	1	S	Truncado	wt
30	bcn-hvh-035	ABS	> 16	R	28T	wt
31	bcn-hvh-036	MAS	> 16	R	Truncado	A2059G
32	bcn-hvh-037	ABS	> 16	R	28T	A2058C
33	bcn-hvh-038	ABS	0,25	S	28C	wt
34	bcn-hvh-039	ABS	> 16	R	28T	wt
35	bcn-hvh-040	MAS	0,5	S	Truncado	wt
36	bcn-hvh-041	BOL	> 16	R	28T	wt
37	bcn-hvh-042	MAS	0,5	S	Truncado	wt
38	bcn-hvh-043	ABS	0,5	S	28C	wt
39	bcn-hvh-045	MAS	1	S	Truncado	wt
40	bcn-hvh-046	MAS	0,5	S	Truncado	wt
41	bcn-hvh-047	ABS	> 16	R	28T	wt

\* Las abreviaciones son: ABS, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; MAS, *M. abscessus* subsp. *massiliense*; BOL, *M. abscessus* subsp. *bolletii*; S, sensible; R, resistente N/A, No aplicable; N/D, No disponible.

### 5.2.3.1.2. Resistencia adquirida

El tratamiento de las infecciones de *M. abscessus* en monoterapia con claritromicina o por combinación de claritromicina con otro antibiótico en cepas con un gen *erm(41)* funcional puede seleccionar mutaciones en el gen *rhl* [79,84,173]. Para observar este mecanismo molecular de selección de mutación en el gen *rhl* disponemos de los datos de PCR-secuenciación de 13 cepas correspondientes a 4 pacientes: cuatro cepas de *M. abscessus* subsp.*abscessus* con un gen *erm(41)* 28C del paciente 1; cuatro cepas de *M. abscessus* subsp.*abscessus* con un gen *erm(41)* con el polimorfismo 28T del paciente 2; dos cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* con un gen *erm(41)* 28T del paciente 3; y, finalmente, dos cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* con un gen *erm(41)* 28T del paciente 4. La tabla 26 recoge los resultados del análisis de la secuenciación de los genes *erm(41)* y *rhl* de estas cepas.

En las cepas del paciente 1 (que tiene un gen *erm(41)* no funcional con el polimorfismo 28C), se observa la selección de una mutación A2058G. En las cepas del paciente 3 (que tiene un gen *erm(41)* funcional 28T), se observa la selección de una mutación A2059G. En las cepas del paciente 2 (con un gen *erm(41)* funcional 28T), se observa la adquisición de una mutación A2057G. En las cepas del paciente 4 (con un gen *erm(41)* funcional 28T), no se observa ninguna selección de mutación en el gen *rhl*.

En lo que se refiere a la cepa 11I141 del paciente 2, observamos un doble pico (heterodúplex) en la secuencia nucleotídica del gen *rrl* en la posición 2057. El heterodúplex sugiere la existencia de una población mixta en la que una parte de la población ha adquirido la mutación y otra no.

La posición 2057 del gen *rrl* corresponde a un nucleótido muy cercano a la diana del sitio de unión de la claritromicina al ARN ribosomal. Cambios en los nucleótidos cercanos a la diana hace que la unión del macrólido sea más inestable y se refleja en la resistencia.

**Tabla 26.** Resistencia adquirida a la claritromicina en el complejo *M. abscessus*.

Paciente	Identificador	Subespecie	Fecha de aislamiento	<i>erm(41)</i>	<i>rrl</i>	CMI claritromicina
<b>1</b>	bcn-hsp-013	<b>ABS</b>	<b>05/06/2007</b>	28C	wt	0,5
<b>1</b>	10I281	<b>ABS</b>	<b>24/10/2010</b>	28C	A2058G	> 16
<b>1</b>	13I330	<b>ABS</b>	<b>08/10/2013</b>	28C	A2058G	> 16
<b>1</b>	bcn-hsp-028	<b>ABS</b>	<b>30/06/2014</b>	28C	A2058G	> 16
<b>2</b>	bcn-hsp-015	<b>ABS</b>	<b>24/03/2009</b>	28T	wt	16
<b>2</b>	11I110	<b>ABS</b>	<b>23/02/2011</b>	28T	wt	< 0,06 <sup>B</sup>
<b>2</b>	11I441	<b>ABS</b>	<b>12/12/2011</b>	28T	A2057G/ A2057 <sup>A</sup>	8 <sup>B</sup>
<b>2</b>	bcn-hsp-029	<b>ABS</b>	<b>01/12/2015</b>	28T	wt	> 16
<b>3</b>	bcn-hsp-016	<b>ABS</b>	<b>17/09/2009</b>	28T	wt	> 16
<b>3</b>	bcn-hsp-027	<b>ABS</b>	<b>05/07/2011</b>	28T	A2059G	> 16
<b>4</b>	04I462	<b>BOL</b>	<b>22/12/2004</b>	28T	wt	N/D
<b>4</b>	05I586	<b>BOL</b>	<b>24/11/2005</b>	28T	wt	N/D

<sup>A</sup> Doble pico en la secuencia nucleotídica.

<sup>B</sup> Lectura a los 3 días.

Las abreviaciones son: ABS, para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; N/D, para no disponible.

La cepa 111141 con el heterodúplex tiene un gen *erm(41)* con el polimorfismo 28T que le confiere resistencia a la claritromicina. La resistencia inducible a la claritromicina se ve reflejada en el antibiograma a los 14 días, pero en el caso de esta cepa con el heterodúplex en la posición 2057 la lectura de los 3 días dio una resistencia de menor nivel, con una CMI de 8 µg/mL. Una población mixta en la posición 2057 del gen *rhl* detectada por un heterodúplex, ha sido también descrita en *Mycobacterium avium*, *Helicobacter pylori* y en otro estudio de *M. abscessus* [84,208,209].

La selección de mutaciones en el gen *rhl* se da tanto en las cepas con genes *erm(41)* 28T como *erm(41)* 28C.

### **5.2.3.2. Aminoglucósidos**

#### **5.2.3.2.1. Resistencia inicial**

La resistencia a los aminoglucósidos en las micobacterias es principalmente debida a la adquisición de mutaciones que alteran la diana (centro de unión del aminoglucósido). En la introducción se describen los principales mecanismos moleculares asociados a la resistencia (página 43). Brevemente, hemos estudiado 3 mecanismos moleculares asociados a la resistencia a los aminoglucósidos. En primer lugar, la diana de los aminoglucósidos es el ARN ribosomal 16S codificado por el gen *rrs*. El polimorfismo A1408G en el gen *rrs* da lugar a resistencia [92,93]. En segundo lugar, la resistencia a los aminoglucósidos puede darse por modificaciones en la proteína ribosomal S12. La proteína S12 se encuentra muy cerca de la diana de estos antibióticos. Finalmente, está

descrita la presencia de genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en el genoma de *M. abscessus* [101]. La presencia de estas enzimas explica la sensibilidad disminuida de *M. abscessus* a los aminoglucósidos, además de eliminar el efecto bactericida de los aminoglucósidos en este complejo [102].

En nuestro estudio, tal y como se muestra en la tabla 26, 3 de los 33 aislamientos mostraron CMI's resistentes tanto a la tobramicina como a la amicacina (una cepa de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, y dos cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus*). Las cepas bcn-hvh-036 (MAS) y bcn-hvh-039 (ABS) muestran la mutación A1408G en el gen *rrs* [92,93]. La cepa bcn-hvh-035 presenta un gen *rrs* salvaje.

**Tabla 27.** Mecanismos moleculares asociados a la resistencia inicial a los aminoglucósidos en el complejo *M. abscessus*.

Paciente	Identificador	Subespecie	Amicacina		Tobramicina		<i>rrs</i>	AAC(2') <sup>^</sup>	Proteína ribosomal S12 <sup>^</sup>
			CMI	Resultado	CMI	Resultado			
1	ben-hsp-013	ABS	8	S	8	I	wt	wt	wt
2	ben-hsp-015	ABS	8	S	4	S	wt	wt	wt
3	ben-hsp-016	ABS	4	S	4	S	wt	wt	wt
5	ben-hsp-011	BOL	4	S	4	S	wt	S2P, S5F, V85A, T107A	wt
9	ben-hsp-012	ABS	8	S	8	I	wt	wt	wt
13	ben-hsp-014	ABS	8	S	8	I	wt	wt	wt
14	ben-hsp-019	ABS	16	S	4	S	wt	wt	wt
16	ben-hsp-021	ABS	16	S	4	S	wt	wt	wt
17	ben-hcl-001	ABS	8	S	8	I	wt	wt	wt
18	ben-hcl-002	ABS	16	S	4	S	wt	wt	wt
19	ben-hcl-003	ABS	8	S	4	S	wt	wt	wt
20	ben-hcl-004	ABS	8	S	4	S	wt	wt	wt
21	ben-hcl-005	ABS	16	S	4	S	wt	wt	wt
22	ben-hcl-006	ABS	8	S	4	S	wt	wt	wt
23	ben-hcl-007	ABS	16	S	4	S	wt	wt	wt
24	ben-hcl-008	MAS	16	S	4	S	wt	wt	wt
25	ben-hcl-009	ABS	8	S	8	I	wt	wt	wt
26	ben-hvh-030	ABS	16	S	4	S	wt	wt	wt
27	ben-hvh-031	ABS	16	S	8	I	wt	wt	wt
28	ben-hvh-033	ABS	16	S	16	R	wt	wt	wt
29	ben-hvh-034	MAS	16	S	8	I	wt	V85A, S175T	wt
30	ben-hvh-035	ABS	64	R	> 16	R	wt	wt	wt
31	ben-hvh-036	MAS	> 64	R	> 16	R	A1408G	V85A, S175T	wt
32	ben-hvh-037	ABS	8	S	8	I	wt	V85A, T107A	wt
33	ben-hvh-038	ABS	16 - 32	I	16	R	wt	wt	wt
34	ben-hvh-039	ABS	> 64	R	> 16	R	A1408G	P159A	wt
35	ben-hvh-040	MAS	16	S	4	S	wt	V85A, S175T	wt
36	ben-hvh-041	BOL	4	S	4	S	wt	S5F, V85A, T107A	wt
37	ben-hvh-042	MAS	8	S	4	S	wt	V85A, S175T	wt
38	ben-hvh-043	ABS	16	S	8	I	wt	wt	wt
39	ben-hvh-045	MAS	8	S	4	S	wt	V85A, S175T	wt
40	ben-hvh-046	MAS	32	I	16	R	wt	V85A, S175T	wt
41	ben-hvh-047	ABS	8	S	4	S	wt	V85A, T107A	wt

<sup>^</sup> Análisis de la secuencia aminoacídica resultado de la traducción de la secuencia nucleotídica.

\* Las abreviaciones son: ABS, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; MAS, *M. abscessus* subsp. *massiliense*; BOL, *M. abscessus* subsp. *bolletii*; S, sensible; y R, resistente.

En la tabla 27 se observa también la comparación de la secuencia nucleotídica traducida a proteína del gen que codifica para la enzima modificadora de aminoglicósidos 2'-N-acetiltransferasa (AAC2') [101-103]. El gen que codifica para la enzima está presente en todas las cepas, tanto sensibles como resistentes. La comparación de las secuencias aminoacídicas muestra algunos polimorfismos. Observamos dos cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* (bcn-hsp-011 y bcn-hvh-041) que presentan 3 cambios aminoacídicos idénticos: un cambio de una serina (S) por una fenilalanina (F) en la posición 5, el cambio de una valina (V) por una alanina (A) en la posición 85 y el cambio de una treonina (T) por una alanina (A) en la posición 107. Además, la cepa bcn-hsp-011 tiene un cambio de una serina (S) por una prolina (P) en la posición 2. Ambas cepas son sensibles a los aminoglicósidos. Por otra parte, 5 de las 6 cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* (bcn-hvh-034, bcn-hvh-036, bcn-hvh-040, bcn-hvh-042 y bcn-hvh-042) tienen la sustitución previamente mencionada de una valina (V) por una alanina (A) en la posición 85 y una nueva sustitución de una serina (S) por una treonina (T) en la posición 175. De estas 5 cepas, tres son sensibles a los aminoglicósidos, una tiene una sensibilidad intermedia a la amicacina y es resistente a la tobramicina y la quinta es resistente a la amicacina y tobramicina pero presenta la mutación en el gen *rrs*. Finalmente, en 4 de las 25 cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* existen sustituciones aminoacídicas en la proteína AAC2'. Dos cepas (bcn-hvh-037 y bcn-hvh-047) tienen las sustituciones de V85A y T107A observadas en las cepas de *M.*

*abscessus* subsp. *bolletii*. Una cepa (bcn-hvh-045) tiene las dos sustituciones V85A y S175T observadas en las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Por último, la cepa bcn-hvh-039 tiene la sustitución aminoacídica de una prolina (P) por una alanina (A) en la posición 159. De estas cuatro cepas, tres son sensibles a la amicacina y una es resistente. La cepa resistente tiene la mutación A1408G en el gen *rrs*.

Es decir, no hemos podido establecer una relación entre los polimorfismos observados en el enzima AAC2' con la resistencia del complejo *M. abscesus* a los aminoglicósidos.

Además, hemos observado como todas las cepas estudiadas tienen la misma secuencia aminoacídica de la proteína S12. La adquisición de mutaciones en la proteína ribosomal S12, codificada por el gen *rpsL*, está relacionado con la resistencia a los aminoglucósidos [94]. En nuestro caso, no hemos observado la selección de mutaciones en ninguna posición de la proteína ribosomal S12.

Estos resultados están de acuerdo con los estudios publicados hasta la fecha, en donde se relaciona la selección de la mutación A1408G en el gen *rrs* a la elevada resistencia a los aminoglucósidos, la presencia de la proteína 2'-N-acetiltransferasa como un mecanismo innato de sensibilidad disminuida de las RGM a los aminoglucósidos y la existencia de cepas resistente por factores aún desconocidos [92,93,99,101-103,110].

Alguna de las explicaciones más plausibles para estas resistencias podría ser una sobreexpresión de la EMAs en estas cepas, la presencia de bombas de expulsión o presencia de

otras EMAs [90,210]. En nuestro estudio no hemos estudiado los genes *eis*, *eis2* ni el regulón *whiB7* que se han asociado a la resistencia de *M. abscessus* a los aminoglucósidos [103,104,211]. El próximo paso para intentar entender la resistencia a los aminoglucósidos en nuestras cepas sería el estudio de estos 3 genes.

#### **5.2.3.2.2. Resistencia adquirida**

La resistencia adquirida a los aminoglucósidos en el complejo *M. abscessus* se da por la selección de mutaciones en el gen *rrs*. La selección de estas mutaciones, a igual que en el resto de las micobacterias, suele deberse a la monoterapia. En las micobacterias se producen mutaciones cromosómicas espontáneas que afectan la diana del fármaco o enzimas que intervienen en la activación de profármacos. Estas mutaciones se dan indefectiblemente y con una frecuencia que depende del fármaco. Es decir, en una población dada, existen células resistentes a cada uno de los fármacos. Cuando se trata con monoterapia, el fármaco utilizado seleccionará las células resistentes al mismo y con el tiempo toda la población será resistente. Por otra parte, se ha descrito la selección de células resistentes cuando se tratan las infecciones de *M. abscessus* con dosis por debajo de la dosis óptima para la inhibición del crecimiento de las cepas [79,92].

En nuestro estudio se observa la adquisición de la mutación A1408G en la cepa de seguimiento bcn-hsp-028 del paciente 1 (Tabla 28).

**Tabla 28.** Mecanismos moleculares asociados a la resistencia adquirida a los aminoglucósidos en el complejo *M. abscessus*.

Paciente	Identificador	Subespecie	Fecha de aislamiento	<i>rrs</i>	AAC(2') <sup> A</sup>	Proteína ribosomal S12 <sup> A</sup>
<b>1</b>	bcn-hsp-013	<b>ABS</b>	<b>05/06/2007</b>	wt	wt	wt
<b>1</b>	10I281	<b>ABS</b>	<b>24/10/2010</b>	N/D	N/D	N/D
<b>1</b>	13I330	<b>ABS</b>	<b>08/10/2013</b>	N/D	N/D	N/D
<b>1</b>	bcn-hsp-028	<b>ABS</b>	<b>30/06/2014</b>	A1408G	wt	wt
<b>2</b>	bcn-hsp-015	<b>ABS</b>	<b>24/03/2009</b>	wt	wt	wt
<b>2</b>	11I110	<b>ABS</b>	<b>23/02/2011</b>	N/D	N/D	N/D
<b>2</b>	11I441	<b>ABS</b>	<b>12/12/2011</b>	N/D	N/D	N/D
<b>2</b>	bcn-hsp-029	<b>ABS</b>	<b>01/12/2015</b>	wt	wt	wt
<b>3</b>	bcn-hsp-016	<b>ABS</b>	<b>17/09/2009</b>	wt	wt	wt
<b>3</b>	bcn-hsp-027	<b>ABS</b>	<b>05/07/2011</b>	wt	wt	wt
<b>4</b>	04I462	<b>BOL</b>	<b>22/12/2004</b>	N/D	N/D	N/D
<b>4</b>	05I586	<b>BOL</b>	<b>24/11/2005</b>	N/D	N/D	N/D

<sup>A</sup> Análisis de la secuencia aminoacídica resultado de la traducción de la secuencia nucleotídica.

\* Las abreviaciones son: ABS, para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; y N/D, para no disponible.

### 5.2.3.3. Fluoroquinolonas

El tratamiento antibiótico con quinolonas en infecciones causadas por micobacterias de crecimiento rápido se considera efectivo tal y como aseguraron Lee y *col.* en 2014 [110]. El principal mecanismo de resistencia a las quinolonas en las micobacterias es la adquisición de mutaciones en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *gyrB* [108,212-214] (introducción página 49). Monego y *col.* en 2012 vieron que 31 de 35 cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* resistentes a la ciprofloxacina tenían un cambio aminoacídico en la posición A92V de *gyrA* [110,215].

En nuestro estudio hemos encontrado 26 de los 33 aislamientos iniciales (79%) con CMIs resistentes al ciprofloxacino y 31 de 33 (94%) con CMIs resistentes al moxifloxacino. Nuestro análisis de las secuencias QRDR (regiones determinantes de la resistencia a quinolonas) de los genes *gyrA* y *gyrB* no ha mostrado ningún cambio aminoacídico que pueda explicar la resistencia. Las posiciones 92 y 96 del QRDR de *gyrA* y las posiciones 492, 495, 516 y 533 del QRDR de *gyrB* son idénticas en las cepas sensibles y resistentes.

Hemos encontrado una cepa de *M. abscessus* subsp *abscessus* (bcn-hcl-006) con un cambio aminoacídico de una serina (S) por una treonina (T) en la posición 734 del *gyrA* (fuera del QRDR). También existen en nuestra serie 5 cepas con un cambio aminoacídico de serina (S) por asparagina (N) en la posición 7 de la proteína de *gyrB* (fuera de la región QRDR).

Estas 5 cepas han sido identificadas como *M. abscessus* subsp. *massiliense*, 4 son resistentes (bcn-hcl-008, bcn-hvh-034, bcn-hvh-042 y bcn-hvh-046) y una es sensible al ciprofloxacino y tiene una sensibilidad disminuída al moxifloxacino (bcn-hvh-040). Además, cabe destacar que la cepa bcn-hvh-034 también tiene otro cambio de treonina (T) por serina (S) en la posición 576 de *gyrB*.

Algunos autores han señalado la existencia de mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* fuera de la región QRDR en cepas resistentes de NTM y tuberculosis, especialmente en *gyrB* [94,111,213,216,217]. El papel de estas mutaciones en la resistencia a las quinolonas no queda claro y debería comprobarse mediante mutación dirigida.

Los datos obtenidos en este estudio están de acuerdo con los porcentajes elevados de resistencia a las quinolonas en el complejo *M. abscessus* [108,110,212-214,218]. Es sorprendente que, a pesar de un elevado porcentaje de cepas resistentes, no hayamos encontrado mutaciones en las regiones QRDR. Otros autores también han observado elevadas resistencias del complejo *M. abscessus* a las quinolonas y no han encontrado mutaciones en los QRDR de las subunidades alfa y beta de la girasa [108,110,111,216].

**Tabla 29.** Mecanismo molecular asociado a la resistencia de las fluoroquinolonas en el complejo *M. abscessus*.

Paciente	Identificador	Subespecie	Ciprofloxacino		Moxifloxacino		GYRA <sup>^</sup>	GYRB <sup>^</sup>
			CMI	Resultado	CMI	Resultado		
1	bcn-hsp-013	ABS	> 4	R	8	R	wt	wt
2	bcn-hsp-015	ABS	> 4	R	4	R	wt	wt
3	bcn-hsp-016	ABS	1	S	2	I	wt	wt
5	bcn-hsp-011	BOL	4	R	4	R	wt	wt
9	bcn-hsp-012	ABS	4	R	8	R	wt	wt
13	bcn-hsp-014	ABS	> 4	R	8	R	wt	wt
14	bcn-hsp-019	ABS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
16	bcn-hsp-021	ABS	2	I	8	R	wt	wt
17	bcn-hcl-001	ABS	> 4	R	8	R	wt	wt
18	bcn-hcl-002	ABS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
19	bcn-hcl-003	ABS	4	R	4	R	wt	wt
20	bcn-hcl-004	ABS	2	I	> 8	R	wt	wt
21	bcn-hcl-005	ABS	> 4	R	8	R	wt	wt
22	bcn-hcl-006	ABS	> 4	R	8	R	S734T	wt
23	bcn-hcl-007	ABS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
24	bcn-hcl-008	MAS	> 4	R	> 8	R	wt	S7N
25	bcn-hcl-009	ABS	> 4	R	4	R	wt	wt
26	bcn-hvh-030	ABS	2	I	4	R	wt	wt
27	bcn-hvh-031	ABS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
28	bcn-hvh-033	ABS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
29	bcn-hvh-034	MAS	> 4	R	> 8	R	wt	S7N, T576S
30	bcn-hvh-035	ABS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
31	bcn-hvh-036	MAS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
32	bcn-hvh-037	ABS	0,5	S	4	R	wt	wt
33	bcn-hvh-038	ABS	> 4	R	2 - 4	R	wt	wt
34	bcn-hvh-039	ABS	> 4	R	> 8	R	wt	wt
35	bcn-hvh-040	MAS	1	S	2	I	wt	S7N
36	bcn-hvh-041	BOL	> 4	R	8	R	wt	wt
37	bcn-hvh-042	MAS	> 4	R	8	R	wt	S7N
38	bcn-hvh-043	ABS	4	R	4	R	wt	wt
39	bcn-hvh-045	MAS	1	S	4	R	wt	wt
40	bcn-hvh-046	MAS	> 4	R	> 8	R	wt	S7N
41	bcn-hvh-047	ABS	4	R	4	R	wt	wt

<sup>^</sup> Análisis de la traducción a proteína de la secuencia nucleotídica del gen.

\* Las abreviaciones son: ABS para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; MAS para *M. abscessus* subsp. *massiliense*; BOL para *M. abscessus* subsp. *bolletii*; y N/A para No Aplicable.

Con los resultados aquí presentados no podemos determinar las bases moleculares del mecanismo de resistencia a las quinolonas. No hemos observado ninguna cepa con el cambio en *gyrA* de A92V descrito por Monego y *col.* [215] como causante mayoritario de la elevada resistencia a las quinolonas. En la publicación de 2012 de de Moura y *col.* [108] postulan que aunque la presencia de una alanina en la posición 92 (de *M. abscessus*) en la subunidad alfa de la girasa está presente en la mayoría de RGM más resistentes a las quinolonas, por sí misma no explica las elevadas CMI de algunas cepas. Tal y como nosotros hemos observado la alanina (A) de la posición 92 está presente en todas nuestras cepas. Deben de existir mecanismos alternativos que producen resistencia frente a las quinolonas, como bombas de expulsión o porinas. Se ha descrito una bomba de eflujo inducible que contribuye a la resistencia a quinolonas en *M. tuberculosis* [219]. En *M. tuberculosis* también se ha descrito una mutación en el gen *eccC<sub>5</sub>* que codifica para una proteína del sistema de expulsión ESX-5 que confiere resistencia contra las quinolonas [220]. También se ha descrito en *M. abscessus* un péptido homólogo al MfpA de *Mycobacterium smegmatis* relacionado con la resistencia a quinolonas [108,110,111,212].

#### 5.2.3.4. Oxazolidinonas

La resistencia a linezolid está asociada con la modificación de la diana. Como se ha comentado en la introducción (página 60) la selección de mutaciones en el gen *rrl* (correspondiente a la región 23S de ARN ribosomal) o en las proteínas ribosomales L3, L4 o L22 causan resistencia al linezolid [96,124,221] .

Nuestros resultados muestran 8 de 33 cepas resistentes al linezolid (24%), 13 intermedias (40%) y 12 sensibles (36%). La tabla 30 recoge los resultados del análisis de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia al linezolid.

En el análisis del gen *rrl* hemos buscado las 11 mutaciones descritas por Long y *col.* en 2010 [124]. Ninguna de nuestras cepas presentó alguna de estas mutaciones. No obstante, dos cepas tenían mutaciones en el gen *rrl*: una cepa presenta la mutación A2059G siendo resistente al linezolid (bcn-hvh-036) y la otra cepa (bcn-hvh-037) presenta la mutación A2058G siendo sensible al linezolid. Ambas mutaciones están relacionadas con la resistencia a los macrólidos pero no con la resistencia al linezolid [172,174]. En el estudio de Long y *col.* una cepa con la mutación A2058G presenta resistencia a los macrólidos pero es sensible al linezolid. Por otra parte, las posiciones 2058 y 2059 están lejos del sitio de unión al linezolid [124].

El análisis de la traducción del gen *rpIC* a la proteína ribosomal L3 no muestra ningún cambio aminoacídico en ninguna de las secuencias.

El análisis de las secuencias de la proteína ribosomal L4 muestra que todas las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* tienen un cambio aminoacídico en la posición 142 de una glicina (G) por una alanina (A). Este cambio aminoacídico no está presente ni en *M. abscessus* subsp. *abscessus* ni en *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Tres de las 7 cepas (bcn-hcl-008, bcn-hvh-034 y bcn-hvh-036) de *M. abscessus* subsp. *massiliense* muestran CMI's resistentes al linezolid, una de las siete cepas (bcn-hvh-046) muestra una CMI intermedia y dos de las siete cepas (bcn-hvh-040 y bcn-hvh-042) muestran CMI's sensibles. Todo ello sugiere que este cambio puede ser un polimorfismo propio de la subespecie *massiliense*.

Además, también observamos un cambio de alanina (A) por prolina (P) en una de estas cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* (bcn-hvh-034) en la posición 175. Otros autores también han descrito la sustitución A175P combinada con la sustitución G142A en cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* sin poder asociarla a la resistencia al linezolid [125, 222]. El cambio A175P de la proteína ribosomal L4 está fuera de la diana del linezolid y no está descrito en la literatura como mecanismos molecular asociado a la resistencia con lo que su papel en la resistencia es incierto y debería ser comprobado.

Por otro lado, las 26 cepas restantes de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (24 cepas) y de *M. abscessus* subsp. *bolletii* (2 cepas) tienen una proteína L4 salvaje igual en todas ellas, sin ningún cambio aminoacídico.

**Tabla 30.** Mecanismo molecular asociado a la resistencia del linezolid en el complejo *M. abscessus*.

Paciente	Identificador	Subespecie	Linezolid		<i>rrl</i>	Proteína ribosomal L3 <sup>^</sup>	Proteína ribosomal L4 <sup>^</sup>	Proteína ribosomal L22 <sup>^</sup>
			CMI	Resultado				
1	bcn-hsp-013	ABS	8	S	wt	wt	wt	wt
2	bcn-hsp-015	ABS	32	R	wt	wt	wt	wt
3	bcn-hsp-016	ABS	< 1	S	wt	wt	wt	wt
5	bcn-hsp-011	BOL	16	I	wt	wt	wt	wt
9	bcn-hsp-012	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
13	bcn-hsp-014	ABS	8	S	wt	wt	wt	wt
14	bcn-hsp-019	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
16	bcn-hsp-021	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
17	bcn-hcl-001	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
18	bcn-hcl-002	ABS	32	R	wt	wt	wt	wt
19	bcn-hcl-003	ABS	8	S	wt	wt	wt	wt
20	bcn-hcl-004	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
21	bcn-hcl-005	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
22	bcn-hcl-006	ABS	4	S	wt	wt	wt	wt
23	bcn-hcl-007	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
24	bcn-hcl-008	MAS	32	R	wt	wt	G142A	wt
25	bcn-hcl-009	ABS	4	S	wt	wt	wt	wt
26	bcn-hvh-030	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
27	bcn-hvh-031	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt
28	bcn-hvh-033	ABS	32	R	wt	wt	wt	wt
29	bcn-hvh-034	MAS	32	R	wt	wt	G142A, A175P	wt
30	bcn-hvh-035	ABS	32	R	wt	wt	wt	wt
31	bcn-hvh-036	MAS	32	R	A2059G	wt	G142A	wt
32	bcn-hvh-037	ABS	8	S	A2058C	wt	wt	wt
33	bcn-hvh-038	ABS	2	S	wt	wt	wt	wt
34	bcn-hvh-039	ABS	32	R	wt	wt	wt	wt
35	bcn-hvh-040	MAS	8	S	wt	wt	G142A	wt
36	bcn-hvh-041	BOL	16	I	wt	wt	wt	wt
37	bcn-hvh-042	MAS	8	S	wt	wt	G142A	wt
38	bcn-hvh-043	ABS	2	S	wt	wt	wt	wt
39	bcn-hvh-045	MAS	8	S	wt	wt	G142A	wt
40	bcn-hvh-046	MAS	16	I	wt	wt	G142A	wt
41	bcn-hvh-047	ABS	16	I	wt	wt	wt	wt

<sup>^</sup> Análisis de la traducción a proteína de la secuencia nucleotídica del gen.

\* Las abreviaciones son: ABS para *M. abscessus* subsp. *abscessus*; MAS para *M. abscessus* subsp. *massiliense*; y BOL para *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

Finalmente, el análisis del alineamiento de la proteína L22 no ha mostrado ningún cambio que pueda ser asociado a la resistencia ya que todas las secuencias aminoacídicas de la proteína L22 son idénticas.

Es decir, nuestros resultados no han reflejado las mutaciones descritas en la bibliografía en relación a la resistencia al linezolid [96,124-126,221]. Otros autores, tampoco han encontrado las mutaciones descritas en sus cepas resistentes [125,222]. Otros mecanismos moleculares alternativos para explicar la resistencia al linezolid podrían deberse a bombas de expulsión o permeabilidad de la membrana [113,222].



### **5.3. Epidemiología molecular del complejo *M. abscessus***

Los estudios de epidemiología molecular se orientaron para que respondieran a dos preguntas completamente distintas:

1. ¿Qué variabilidad existe entre las cepas de *M. abscessus*? ¿Cada paciente tiene un clon único o las cepas de varios pacientes se agrupan en clusters que pueden corresponder a cadenas de transmisión?
2. Cuando un paciente presenta una infección crónica aislándose repetidamente *M. abscessus*, ¿Las distintas cepas aisladas son el mismo clon (recidivas) o clones distintos (reinfecciones)?



### **5.3.1. Estudio de la variabilidad dentro de *M. abscessus***

Estudiar las posibles cadenas de transmisión de las NTM es más complejo que estudiar la epidemiología de *M. tuberculosis*, tal y como hemos comentado en la introducción (página 71). *M. tuberculosis* tiene un hábitat exclusivamente humano y la transmisión se da de un paciente con tuberculosis respiratoria a un huésped susceptible por vía aérea, por lo que cuando un grupo de pacientes comparte el mismo clon forma parte de una cadena de transmisión inter-humana. Las MNT en cambio tienen un reservorio ambiental. Cuando un grupo de pacientes comparte el mismo clon de una MNT, si bien cabe la posibilidad de una transmisión entre ellos, se acepta que suele representar la adquisición del mismo clon ambiental de forma independiente.

La forma clásica descrita de contraer la infección pulmonar por *M. abscessus* es la adquisición de las bacterias a partir del ambiente por un huésped susceptible [33,34]. En el complejo *M. abscessus*, Bryant y col. han sugerido la transmisión directa entre pacientes, pero en estos momentos es un tema de debate [32,137].

El aislamiento en los pacientes de clones predominantes a nivel global está extensamente aceptada [32, 77,135]. Ello quiere decir que pacientes no relacionados epidemiológicamente comparten el mismo clon. Además de la existencia de clones predominantes, cabe destacar la gran capacidad de *M. abscessus* de sobrevivir en el ambiente [32,40,135].

La existencia de clones predominantes y la capacidad de supervivencia de *M. abscessus* en el ambiente hacen muy difícil validar las cadenas de transmisión entre pacientes. Esto es, tal como se ha comentado, cuando dos pacientes comparten el mismo clon pueden formar parte de una cadena de transmisión entre pacientes o haber adquirido de forma independiente el mismo clon a partir del ambiente.

Para comparar el poder discriminativo de los diferentes marcadores utilizados hemos calculado el índice de diversidad de Simpson. Este índice, también conocido como el índice de diversidad de las especies, representa la probabilidad de que dos cepas distintas sean vistas como tales por el marcador utilizado [176].

En nuestro grupo de pacientes hemos estudiado la epidemiología del complejo *M. abscessus* utilizando el análisis de VNTR, MLST y WGS. Para comprobar la existencia de clones predominantes a nivel global hemos utilizado también resultados de VNTR publicados en la bibliografía, los de MLST de la base del Instituto Pasteur o en la WGS un conjunto de cepas del grupo del hospital Great Ormond Street (Londres).

#### **5.3.1.1. Estudio por *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR)**

La técnica de análisis de VNTR, tal y como se describe en la introducción (página 75), se basa en la amplificación de regiones del genoma de la bacteria que contienen secuencias repetidas de forma directa en tándem. El número de repeticiones de estas secuencias varía de una cepa a otra. El

número de repeticiones es igual en cepas filogenéticamente más cercanas mientras que varía entre cepas alejadas.

Las cepas con patrones de VNTR únicos corresponderían a casos endémicos de la infección, mientras que las cepas agrupadas (con el mismo perfil de VNTR) pueden pertenecer a un clon predominante o formar parte de una cadena de transmisión. La existencia de estos clones predominantes, como hemos comentado, genéticamente muy cercanos, hace imposible que el análisis de los perfiles de VNTR puedan discriminar entre cadena de transmisión o clon ambiental predominante.

En nuestro estudio hemos utilizado el análisis de VNTR de 17 *loci* [31] para observar la distribución epidemiológica de *M. abscessus* en Barcelona.

La tabla 31 muestra los perfiles de VNTR de los primeros aislamientos de Barcelona. De las 33 cepas, 19 (57,6%) presentaron un perfil único y 14 cepas (42,4%) se agruparon en cinco clusters. Los clusters los hemos definido como la agrupación de cepas con perfiles de VNTR idénticos.

La expresión gráfica de los resultados descritos en la tabla 31 se realizó mediante MST.

La imagen de la figura 27 muestra el MST creado a partir de los perfiles de VNTR de 17 loci de las muestras del complejo *M. abscessus* aisladas en Barcelona.

**Tabla 31.** Análisis de VNTR de las cepas de *M. abscessus* de Barcelona.

Paciente	Identificador	Subespecie	TR2	TR45	TR86	TR101	TR109	TR116	TR131	TR137	TR139	TR149	TR150	TR155	TR163	TR167	TR172	TR179	TR200	Perfil de VNTR	Análisis de VNTR
1	ben-hsp-013	ABS	4	2	4	2	3	3	3	5	3	3	2	4	2	6	2	3	2	4242333532426232	Cluster I
2	ben-hsp-015	ABS	3	2	1	2	2	3	3	1	10	3	4	1	2	1	4	2	3	321223311034121423	Único
3	ben-hsp-016	ABS	6	3	2	2	4	4	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63224432334342432	Único
5	ben-hsp-011	BOL	2	3	2	1	3	3	1	3	3	2	2	2	2	4	2	2	3	2321331332224223	Cluster V
9	ben-hsp-012	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	4	3	5	2	4	3	2	63223432334352432	Único
13	ben-hsp-014	ABS	2	3	3	2	4	4	3	3	6	1	4	6	3	3	2	3	-	233244361463323-	Único
14	ben-hsp-019	ABS	4	2	4	2	3	3	3	5	3	3	2	4	2	6	2	3	2	4242333532426232	Cluster I
16	ben-hsp-021	ABS	6	3	2	2	4	3	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63224332334342432	Único
17	ben-hel-001	ABS	3	2	4	2	3	3	3	5	3	3	2	4	2	2	2	3	0	3242333532422230	Único
18	ben-hel-002	ABS	5	2	1	2	4	3	3	1	3	4	1	2	3	3	5	3	2	52124331341223352	Único
19	ben-hel-003	ABS	5	2	1	2	3	2	3	4	5	3	3	1	4	6	2	3	2	52123234533146232	Único
20	ben-hel-004	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63223432334342432	Cluster II
21	ben-hel-005	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63223432334342432	Cluster II
22	ben-hel-006	ABS	4	2	3	2	3	4	3	1	9	2	1	4	2	2	2	3	1	42323431921422231	Único
23	ben-hel-007	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63223432334342432	Cluster II
24	ben-hel-008	MAS	-	2	1	1	4	2	2	2	2	2	3	1	2	4	1	3	2	-211422223124132	Único
25	ben-hel-009	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63223432334342432	Cluster II
26	ben-hvh-030	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63223432334342432	Cluster II
27	ben-hvh-031	ABS	6	3	2	2	4	3	3	2	3	3	4	3	4	2	3	3	2	63224332334342332	Único
28	ben-hvh-033	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	3	1	4	2	2	3	2	63223432333142232	Único
29	ben-hvh-034	MAS	2	2	2	1	2	2	2	2	3	3	2	1	2	3	2	5	-	2221222233212325-	Único
30	ben-hvh-035	ABS	6	3	2	2	3	4	3	2	3	3	4	3	4	2	4	3	2	63223432334342432	Cluster II
31	ben-hvh-036	MAS	2	2	1	1	4	2	2	2	2	2	3	1	2	4	2	3	2	2211422223124232	Cluster IV
32	ben-hvh-037	ABS	-	3	1	2	3	5	2	2	5	1	4	5	2	3	2	3	3	-3123522514532323	Cluster III
33	ben-hvh-038	ABS	5	2	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	4	2	4	3	-	5232333433244243-	Único
34	ben-hvh-039	ABS	3	2	4	2	2	1	2	2	4	3	4	2	5	3	3	3	-	3242212243425333-	Único
35	ben-hvh-040	MAS	2	2	1	1	4	2	2	2	2	2	3	1	2	4	2	3	-	2211422223124232	Cluster IV
36	ben-hvh-041	BOL	2	3	2	1	3	3	1	3	3	2	2	2	2	4	2	2	3	2321331332224223	Cluster V
37	ben-hvh-042	MAS	2	2	1	1	4	2	2	2	2	2	3	1	2	4	2	3	-	2211422223124232	Cluster IV
38	ben-hvh-043	ABS	5	2	4	2	3	3	3	5	3	3	4	4	2	2	7	3	-	5242333533442273-	Único
39	ben-hvh-045	MAS	2	2	1	1	4	2	2	2	2	2	3	1	2	4	2	3	-	221142222312420	Cluster IV
40	ben-hvh-046	MAS	-	3	3	1	3	2	2	4	2	2	4	3	2	3	1	2	-	-3313224242432312-	Único
41	ben-hvh-047	ABS	-	3	1	2	3	5	2	2	5	1	4	5	2	3	2	3	3	-3123522514523233	Cluster III

La tabla muestra todos los perfiles de VNTR de todos los primeros aislamientos de las cepas del complejo *M. abscessus* del estudio. Las abreviaciones son: ABS, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, *M. abscessus* subsp. *bolletii*; MAS, *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

### **5.3.1.2. Análisis de las agrupaciones generadas por VNTR en Barcelona**

#### **5.3.1.2.1. *M. abscessus* subsp. *abscessus***

Diez de las 24 cepas pertenecientes a la subespecie *M. abscessus* subsp. *abscessus* se agrupan en 3 clusters. El Cluster I se compone de 2 cepas aisladas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSP). El Cluster II está formado por 6 cepas: 4 cepas aisladas en el Hospital Clínic de Barcelona (HCL) y dos cepas aisladas en el Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona (HVH). El Cluster III está formado por dos cepas del Hospital de la Vall d'Hebron.

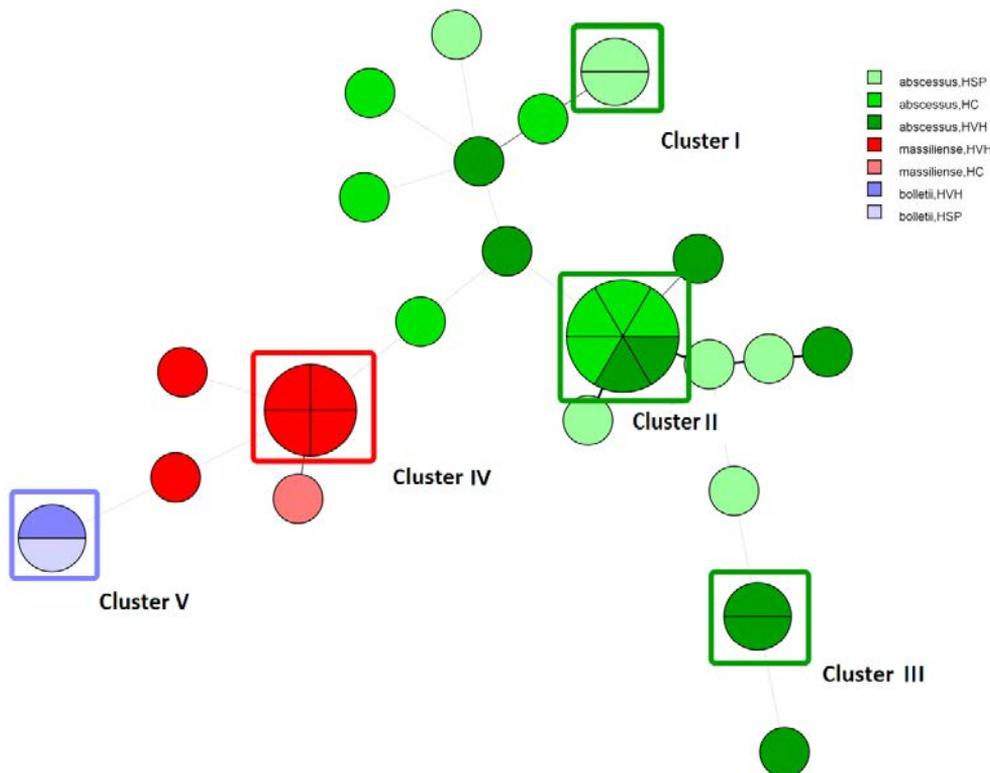
#### **5.3.1.2.2. *M. abscessus* subsp. *massiliense* y *M. abscessus* subsp. *bolletii***

De las siete cepas de la subespecie *M. abscessus* subsp. *massiliense* cuatro se agrupan en el Cluster IV, todas ellas aisladas en el HVH. Finalmente, las dos cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* se agrupan formando el Cluster V, una aislada en el HSP y la otra en el HVH.

Con los resultados obtenidos observamos agrupaciones de cepas aisladas en diferentes pacientes del mismo o distinto hospital con perfiles de VNTR idénticos. Es importante remarcar que los pacientes que forman parte de una de estas agrupaciones pertenecen a hospitales distintos o, cuando pertenecen al mismo hospital, no han coincidido en el tiempo. Estos resultados concuerdan con los resultados publicados en 2012 y 2014 por Wong y *col.* y Yoshida y *col.* respectivamente

[31,143]. Ambos autores observan la agrupación de cepas de *M. abscessus* en diferentes clusters. Yoshida y col. observan como cepas de diferentes localizaciones geográficas (Malasia y Japón) forman agrupaciones. Posteriormente, Bryant y col. [32] utilizaron los datos del análisis de WGS de más de 1000 aislamientos de *M. abscessus* de diferentes localizaciones alrededor del mundo para demostrar la existencia de clones prevalentes a nivel global y sugieren la posibilidad de transmisión de paciente a paciente como la vía para la difusión de estos clones.

**Figura 27.** Epidemiología de *M. abscessus* en Barcelona por VNTR.



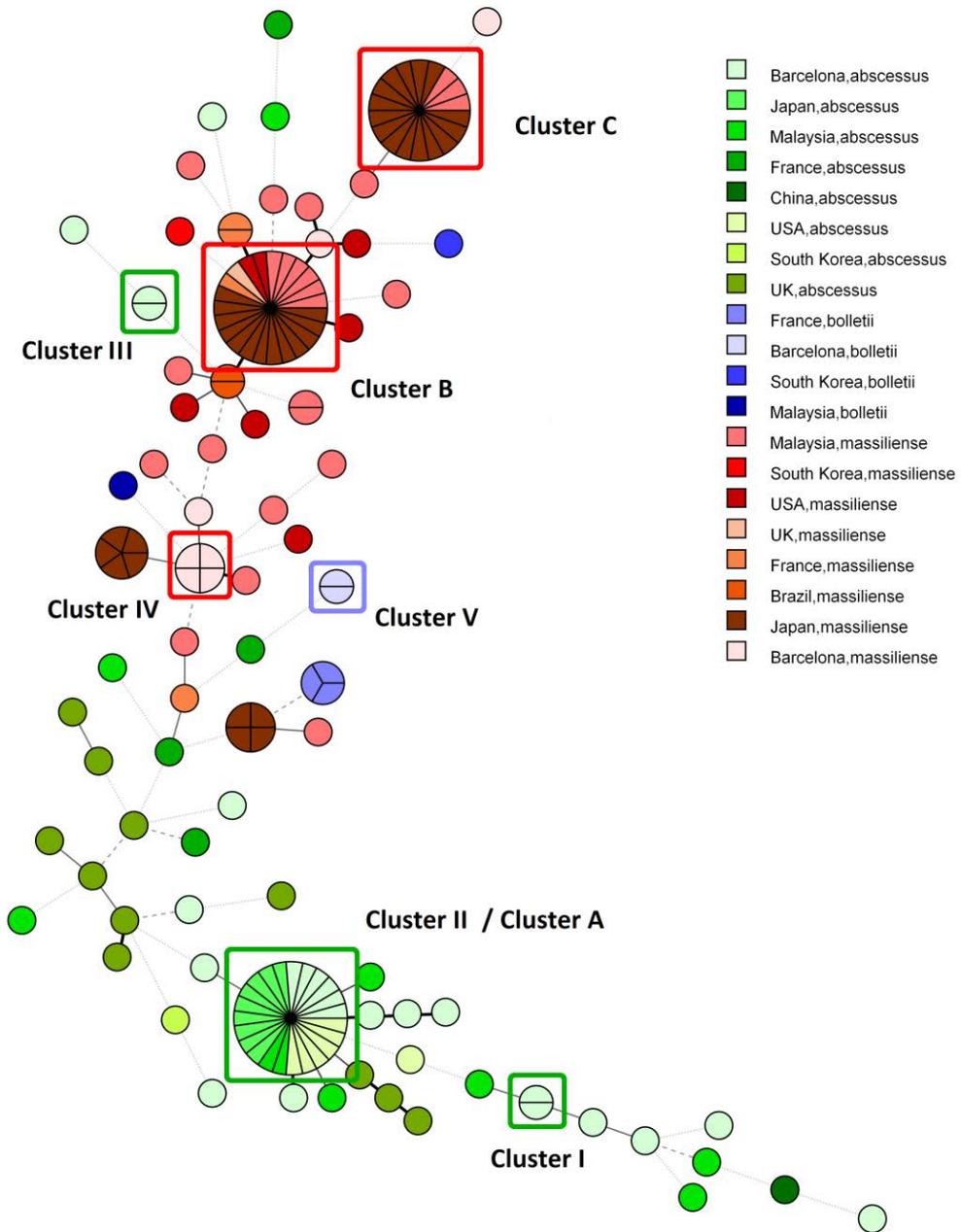
\* En verde, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; en rojo, *M. abscessus* subsp. *massiliense*; y en azul *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Los rectángulos muestran los clusters obtenidos en el análisis de perfiles de VNTR.

### **5.3.1.3. Análisis de las agrupaciones generadas por VNTR a nivel global**

Teniendo en cuenta nuestros resultados y la posibilidad de que los clusters que observamos corresponden a un clon predominante a nivel global, el siguiente paso fue comparar nuestros perfiles de VNTR con perfiles publicados, perfiles originados *in silico* y perfiles facilitados por el doctor Yoshida (Kinki-chuo Chest Medical Center, Osaka, Japón).

Utilizamos 157 perfiles de 17 loci de VNTR para crear un MST con datos de cepas aisladas en Barcelona (24 ABS, 7 MAS y 2 BOL), Japón (9 ABS y 37 MAS), Malasia (10 ABS, 24 MAS y 1 BOL), Francia (4 ABS, 4 MAS y 3 BOL), China (1 ABS), Estados Unidos (7 ABS y 7 MAS), Korea del Sur (1 ABS, 1 MAS y 1 BOL), Reino Unido (11 ABS y 1 MAS) y Brasil (2 MAS). La figura R4 muestra el MST resultante del análisis de los 157 perfiles de VNTR.

**Figura 28.** Epidemiología global de *M. abscessus* por VNTR.



\* En verde, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; en rojo, *M. abscessus* subsp. *massiliense*; y en azul *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Los rectángulos muestran los clusters obtenidos en el análisis de perfiles de VNTR. Los números romanos corresponden a la nomenclatura de este trabajo. Las letras mayúsculas a la nomenclatura del trabajo de Yoshida [31].

#### **5.3.1.3.1. *M. abscessus* subsp. *abscessus***

Se puede observar cómo cepas aisladas en pacientes de Japón, Malasia, Estados Unidos, Francia , Reino Unido y Barcelona se agrupan formando el Cluster II de *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Este cluster denominado Cluster II por nosotros corresponde al Cluster A descrito por Yoshida y col. en 2014 [31]. Esto es, al añadir los perfiles de cepas de otras partes del mundo observamos la agrupación de éstas con las cepas aisladas en Barcelona, sugiriendo la pertenencia de todas las cepas del Cluster II a un clon predominante a nivel global.

Por contra, las cepas agrupadas en el Cluster I y el Cluster III que hemos descrito anteriormente no incluyen cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* de otras partes del mundo. Estos resultados indicarían que las cepas agrupadas en los clusters Cluster I y Cluster III estarían presentes sólo en Barcelona. Esto pasa de igual forma con el Cluster V de nuestras dos cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

#### **5.3.1.3.2. *M. abscessus* subsp. *massiliense***

Por otro lado, la imagen de la figura 28 también muestra la agrupación de las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* en 3 clusters. El Cluster IV corresponde a las 4 cepas de Barcelona aisladas en el mismo hospital (HVH). A pesar de que en Barcelona no se detectan, la imagen también muestra la agrupación de cepas de 7 países diferentes en el Cluster B [31]. El último cluster que se aprecia corresponde a la agrupación de cepas de Japón y Malasia en el Cluster C.

Con los resultados obtenidos con el análisis de VNTR podemos afirmar que existen algunas cepas idénticas en perfil de VNTR a nivel global. Esto ratifica la existencia de clones prevalentes circulantes a nivel mundial como defienden algunos autores [32,59,135,202]. Aunque, es imprescindible matizar que la técnica utilizada tiene limitaciones.

Utilizando las 33 cepas de Barcelona, el VNTR tiene un poder de discriminación de 0,045. El poder discriminativo del análisis de VNTR es suficiente para distinguir las cepas con perfil único o entre clusters pero no tiene potencia suficiente para discriminar entre cepas pertenecientes al mismo cluster y establecer posibles cadenas de transmisión, sobretodo teniendo en cuenta la existencia de clones circulantes predominantes a nivel global. Esto es, la técnica de VNTR es capaz de determinar diferencias cuando los perfiles son diferentes pero en el caso de que los perfiles sean iguales se necesitan otras técnicas más potentes para inferir la transmisión.

A nivel global, la distribución de las 3 subespecies no es uniforme. Con la técnica del análisis de los perfiles de VNTR se observa la separación de *M. abscessus* subsp. *abscessus* de *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Pero, las cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* parecen estar mezcladas con las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Esto en parte es debido a la baja representación de cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Además también observamos una mezcla de algunas cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* y *M. abscessus* subsp. *abscessus* con cepas de otras subespecies. Este hecho podría

ser el resultado de la transmisión horizontal de genes entre las subespecies del complejo como se ha observado en estudios de WGS [36,58]. También podría deberse a una identificación incorrecta de las cepas cuyos VNTR hemos utilizado para comparar con las de Barcelona.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el siguiente paso que dimos fue observar la distribución de las cepas con otro marcador molecular. La técnica del MLST tiene la ventaja de poder comparar nuestros resultados con los depositados en la base de datos pública de perfiles MLST de *M. abscessus* (disponible en <http://bigsd.b.pasteur.fr/mycoabscessus/mycoabscessus.html>).

#### **5.3.1.4. Epidemiología del complejo *M. abscessus* por MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) en Barcelona**

El *MultiLocus Sequence Typing* o MLST de *M. abscessus* se basa en el estudio de los polimorfismos en las secuencias parciales de 7 genes estructurales presentes en todos los aislamientos pertenecientes al complejo *M. abscessus* (Introducción página 77)[146]. Utilizando el esquema descrito por Macheras y col. en 2014 y la base de datos pública del Instituto Pasteur (disponible en <http://bigsd.b.pasteur.fr/mycoabscessus/mycoabscessus.html>) analizamos las cepas de los 33 primeros aislamientos de Barcelona y luego los comparamos contra todos los perfiles colgados en el repositorio web.

En el análisis por MLST nuestra población presenta 10 cepas (30%) con patrón único y 23 cepas (70%) agrupadas en cinco clusters. El poder discriminativo del análisis de MLST para el taxón calculado por índice de diversidad de Simpson en las 33 cepas de Barcelona es de 0,14. La tabla 32 y la figura 29 muestran la agrupación de los aislamientos de Barcelona. Los 5 clusters detectados son prácticamente idénticos a los clusters observados en el análisis de VNTR pero con algunas diferencias que pasamos a detallar.

#### **5.3.1.4.1. *M. abscessus* subsp. *abscessus***

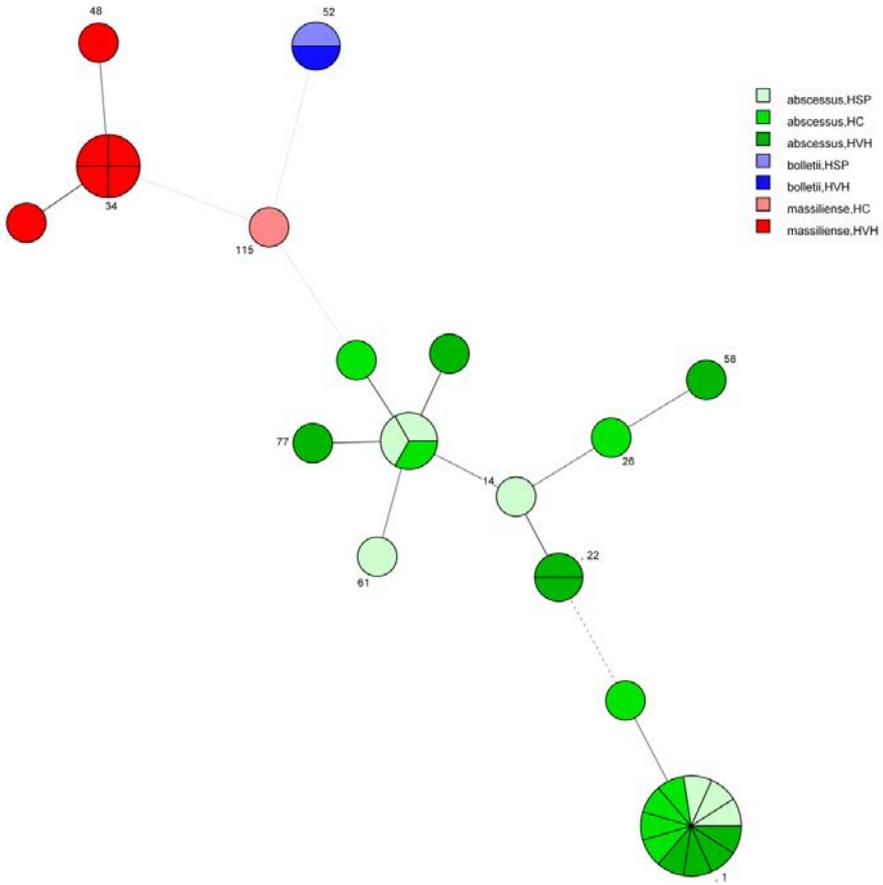
Dieciséis cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* se agrupan en tres clusters: ST-1 (12 cepas), formado por 3 cepas del HSP, 5 del HCL y 4 del HVH; ST-22, formado por dos cepas del HVH; Cluster ST-I (sin ST asignado), formado por 2 cepas del HSP y 1 cepa del HCL.

Comparando los resultados del MLST con los del VNTR observamos que en el Cluster I la cepa del HC se diferencia de las dos del HSP por VNTR.

Por otro lado el ST-1 está formado por 12 cepas. Seis de estas 12 cepas se corresponden con las 6 cepas que forman el Cluster II de VNTR. Las otras 6 cepas del ST-1 son cepas que por VNTR presentan un perfil único.

Finalmente, el ST-22 está formado por las dos cepas del HVH que comparten el mismo perfil de VNTR (Cluster III).

**Figura 29.** Epidemiología de *M. abscessus* en Barcelona por MLST.



\* Los números indican el ST al cual pertenecen. Los colores verdes corresponden a *M. abscessus* subsp. *abscessus*, los rojos a *M. abscessus* subsp. *massiliense*, y los azules a *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

**Tabla 32.** Análisis de MLST de las cepas de *M. abscessus* de Barcelona.

Paciente	Identificador	Subespecie	<i>argH</i>	<i>cya</i>	<i>glpK</i>	<i>gnd</i>	<i>murC</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	ST
1	bcn-hsp-013	ABS	3	11	1	3	3	3	10	ST-I
2	bcn-hsp-015	ABS	3	12	1	3	5	3	1	14
3	bcn-hsp-016	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
5	bcn-hsp-011	BOL	4	4	5	7	15	8	11	52
9	bcn-hsp-012	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
13	bcn-hsp-014	ABS	3	11	1	12	5	3	19	61
14	bcn-hsp-019	ABS	3	11	1	3	3	3	10	ST-I
16	bcn-hsp-021	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
17	bcn-hcl-001	ABS	3	11	1	3	3	3	10	ST-I
18	bcn-hcl-002	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
19	bcn-hcl-003	ABS	3	12	1	8	5	18	3	26
20	bcn-hcl-004	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
21	bcn-hcl-005	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
22	bcn-hcl-006	ABS	24	11	1	3	3	1	10	
23	bcn-hcl-007	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
24	bcn-hcl-008	MAS	24	20	1	9	8	8	27	115
25	bcn-hcl-009	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
26	bcn-hvh-030	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
27	bcn-hvh-031	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
28	bcn-hvh-033	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
29	bcn-hvh-034	MAS	11	13	2	10	1	13	2	48
30	bcn-hvh-035	ABS	1	1	1	1	1	1	1	1
31	bcn-hvh-036	MAS	11	20	4	10	8	13	2	34
32	bcn-hvh-037	ABS	3	1	1	3	5	15	1	22
33	bcn-hvh-038	ABS	3	11	1	3	3	12	3	77
34	bcn-hvh-039	ABS	20	12	1	19	5	11	3	58
35	bcn-hvh-040	MAS	11	20	4	10	8	13	2	34
36	bcn-hvh-041	BOL	4	4	5	7	15	8	11	52
37	bcn-hvh-042	MAS	11	20	4	10	8	13	2	34
38	bcn-hvh-043	ABS	3	1	1	3	3	5	10	
39	bcn-hvh-045	MAS	11	20	4	10	8	13	2	34
40	bcn-hvh-046	MAS	11	20	4	10	8	13	2	34
41	bcn-hvh-047	ABS	3	1	1	3	5	15	1	22

\* Las abreviaciones son: MABS, para *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*; MAS, para *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*; BOL, para *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*.

#### **5.3.1.4.2. *M. abscessus* subsp. *massiliense* y *M. abscessus* subsp. *bolletii***

Las cuatro cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* del HVH pertenecen al ST-34. Las dos cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, una del HSP y la otra del HVH, pertenecen al ST-52.

Las 4 cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* que corresponden al Cluster IV por VNTR pertenecen al mismo ST (ST-34). Las dos cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* que comparten el mismo perfil de VNTR agrupadas en el Cluster V tienen el mismo ST (ST-52).

Hemos observado como tanto VNTR y MLST agrupan cepas de diferentes pacientes en clusters muy similares. Sin embargo, en función de nuestros resultados podemos afirmar que el VNTR es más discriminativo que el MLST (ID 0,045 vs ID 0,14). El VNTR es capaz de atribuir un perfil único a 6 cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* que tienen el mismo perfil de MLST (ST-1). Además, el VNTR es capaz de segregar la cepa bcn-hcl-001 del Cluster I mientras que el MLST la agrupa con las cepas bcn-hsp-013 y bcn-hsp-019.

Al observar la persistencia de agrupaciones de cepas pertenecientes a pacientes que no han coincidido en el tiempo y el espacio, quisimos comparar nuestros resultados con los resultados publicados por otros autores para observar si estas agrupaciones correspondían a clones predominantes. Más en concreto, utilizamos todos los perfiles (234) y aislamientos (352: 219 ABS, 122 MAS y 44 BOL) publicados en la base pública del Institut Pasteur.



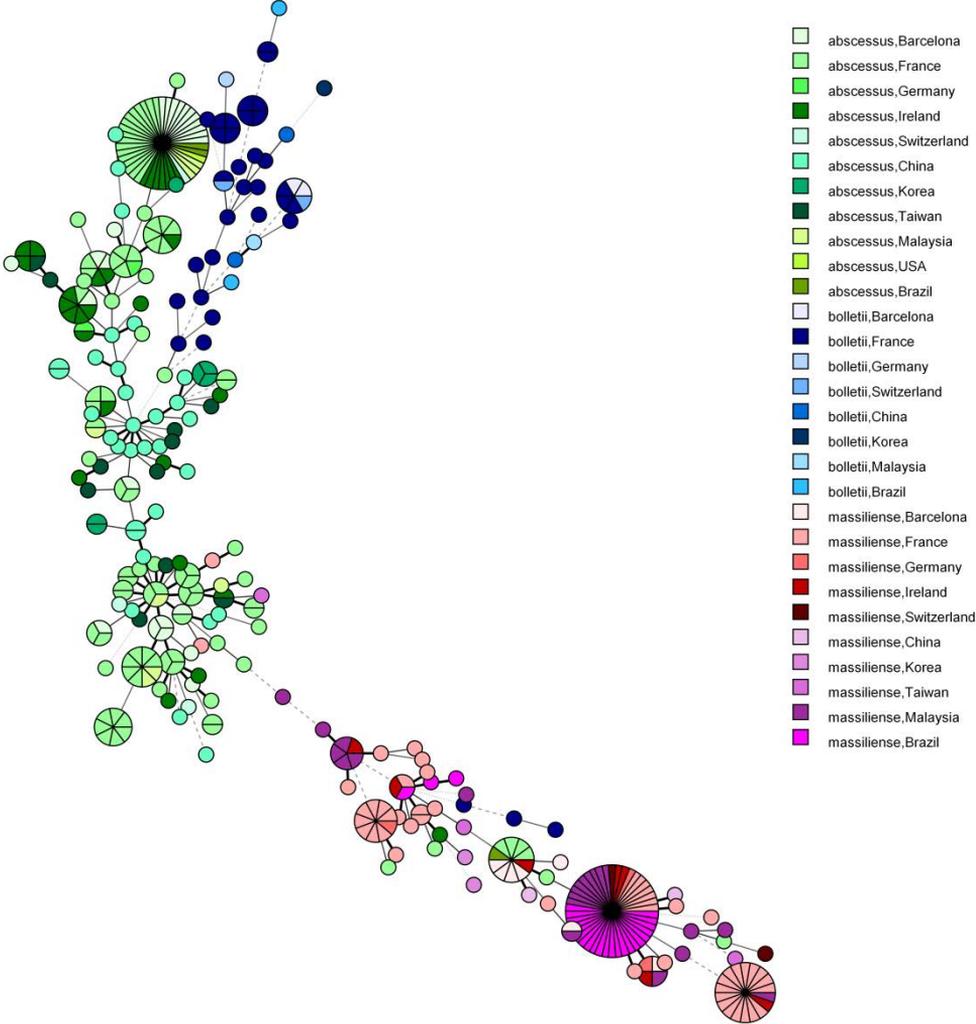
### **5.3.1.5. Epidemiología del complejo *M. abscessus* por MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) a nivel global**

En la figura 30 se pueden apreciar las agrupaciones de cepas de diferentes partes del mundo. Se pueden observar varios clusters de *M. abscessus* subsp. *abscessus* y de *M. abscessus* subsp. *massiliense* con un gran número de cepas agrupadas. En la imagen se puede observar como el análisis de MLST es capaz de separar las 3 subespecies del complejo mejor que el análisis de VNTR. Esto puede ser debido al enfoque más filogenético de este marcador, al incremento en el número de cepas y/o al aumento de cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*. De todas formas existen algunas cepas identificadas como *M. abscessus* subsp. *abscessus* que se agrupan con cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* como se observa en la parte inferior de la imagen. Esto también ocurre con 3 cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* que tienen un perfil de MLST de *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

En nuestros resultados vemos como las agrupaciones que se observan en las dos técnicas son muy similares. Ambas técnicas muestran la agrupación de cepas aisladas en hospitales de diferentes localizaciones geográficas y cuyos aislamientos se dieron en fechas muy distantes. Este hecho, tal como hemos comentado reiteradamente, está de acuerdo con las publicaciones que hablan de la existencia de clones prevalentes circulantes a nivel mundial [32,135].

Así pues, los marcadores clásicos utilizados (VNTR y MLST) han servido para descartar una cadena de transmisión cuando las cepas presentan patrones únicos (*rule out*) pero no nos han permitido afirmar la transmisión cuando las cepas están agrupadas (*rule in*). El enorme poder discriminativo de la WGS despertó la expectativa que su uso en epidemiología molecular sirva tanto para descartar como para afirmar que una cepa pertenezca a una cadena de transmisión.

**Figura 30.** Epidemiología global de *M. abscessus* por análisis de MLST.



\* Los colores verdes corresponden a *M. abscessus* subsp. *abscessus*, los rojos a *M. abscessus* subsp. *massiliense*, y los azules a *M. abscessus* subsp. *bolletii*.



### **5.3.1.6. Epidemiología del complejo *M. abscessus* por secuenciación masiva (WGS)**

La WGS es considerada la técnica más potente de análisis molecular. Recordando brevemente, la técnica de WGS permite la secuenciación del genoma completo de varias cepas a la vez. Es capaz de resolver la agrupación de cepas en falsos clusters y de inferir posibles cadenas de transmisión, como se ha observado en *M. tuberculosis* y otros organismos (incluido *M. abscessus*) [32,137,223,224].

#### **5.3.1.6.1. Definición de cluster**

Nosotros hemos estudiado la epidemiología del complejo por WGS con las 36 cepas de Barcelona (33 primeros aislamientos y 3 cepas aisladas en el seguimiento de los pacientes) y 144 cepas aisladas en el Great Ormond Street Hospital Londres, Reino Unido (32 primeros aislamientos y 112 cepas aisladas en el seguimiento de los pacientes). Para poder establecer y definir los criterios para crear los clusters hemos calculado la diferencia de SNPs existente entre las cepas. Este análisis se ha realizado para el conjunto de cepas, para cada subespecie y para cada cluster. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 31.

Los resultados muestran como la deriva genética entre las subespecies de *M. abscessus* y los distintos clusters es diferente. Las diferencias entre las 3 subespecies son superiores a 120.000 SNPs. Las cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus* presentan entre ellas diferencias de SNP que oscilan entre 0 y 90.000. En las de *M. abscessus* subsp. *massiliense*

estas diferencias de SNP van de 0 a 103.000. Por último en *M. abscessus* subsp. *bolletii* entre 875 y 4.000. En *M. abscessus* subsp *abscessus*, las 20 cepas pertenecientes al cluster ST-1 presentan diferencias entre 0 y 100 SNPs, mientras que las diferencias de SNPs para los 7 miembros del cluster ST-26 van de 10 a 900 SNPs. En *M. abscessus* subsp. *massiliense* las diferencias entre las cepas del cluster ST34 van de 10 a 1000 SNPs.

**Figura 31.** Frecuencia de las distancias de pares entre todos los aislamientos de *M. abscessus*.

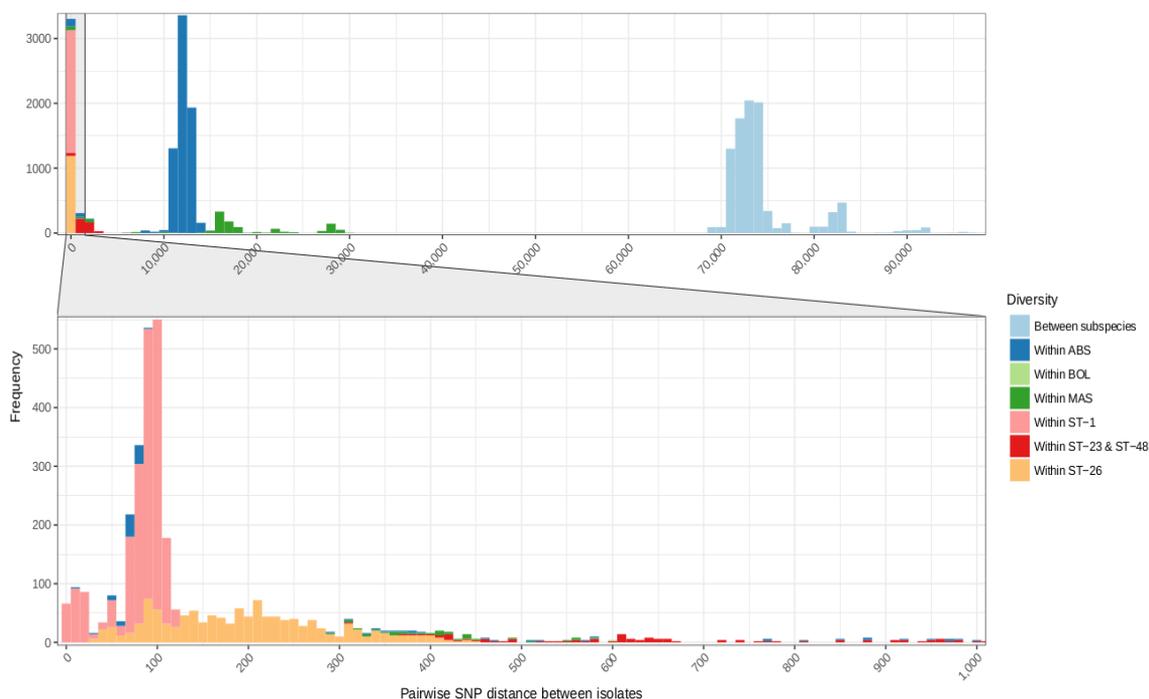


Gráfico creado a partir de la matriz de diferencia de SNPs de los *reads* mapeados al genoma de referencia ATCC 19977. El gráfico superior contiene todas las cepas mientras que el gráfico inferior contiene únicamente las diferencias entre 0 y 1000 SNPs.

Estos resultados sugieren diferencias importantes en la deriva genética del complejo *M. abscessus*. Las cepas que por MLST se agrupan en el cluster ST-1 tienen un genoma mucho más conservado y tienen una estructura más clonal. Mientras que las cepas agrupadas en el cluster ST-26 o las cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* tienen más diferencias de SNPs entre ellas. Así pues, dado que cada cluster de *M. abscessus* muestra una deriva genética diferente, el uso de un umbral absoluto de SNPs para definir una agrupación en todo el taxón se aproxima muy poco a la realidad. Cada agrupación de *M. abscessus* debe de estudiarse independientemente. Por ello, para cada cluster, hemos mapeado las cepas utilizando un genoma más próximo a ese cluster. Dado que la comparación entre cepas se realiza utilizando la parte que comparten del genoma, al utilizar una secuencia de referencia más próxima a las cepas de cada cluster lo que hacemos es mapear más partes del genoma presentes en esas cepas dada su proximidad filogenética que implica una mayor conservación del genoma. En el análisis de los clusters también se ha incluido la información del genoma accesorio recogida en un *heatmap* de presencia y ausencia de genes. Toda esta información permite observar más diferencias y/o similitudes entre cepas que analizando el *core-genome* únicamente.

Hemos creado 3 árboles utilizando todas las cepas disponibles. Para establecer los clusters en primer lugar hemos establecido un umbral de SNPs calculado a partir de la distancia máxima de SNPs entre las cepas de un mismo paciente. Hemos utilizado la matriz de SNPs de alineamiento por parejas para calcular la

diversidad genética de las cepas dentro de un mismo paciente y establecer una agrupación jerárquica en la que las cepas de diferentes pacientes agrupadas necesitan tener menos diferencias entre si que las distintas cepas aisladas del mismo paciente para considerarse un cluster.

Por otra parte, hemos utilizado la herramienta rPinecone para asignar clusters. Esta herramienta incorpora los umbrales de SNPs y las distancias entre una cepa determinada y la raíz del árbol. De esta forma no solo utiliza el umbral de SNPs calculado entre dos cepas sino también su distancia contra la raíz del árbol para establecer relación entre las cepas. Es una herramienta que ha tenido éxito en separar poblaciones clonales [177].

Así pues, para establecer un cluster por WGS, las cepas que lo forman tienen que tener diferencias de SNPs por debajo del umbral calculado a partir de las cepas de un mismo paciente y además tienen que quedar agrupadas también por la herramienta rPinecone.

#### **5.3.1.6.2. Epidemiología del complejo *M. abscessus* por WGS**

Como se verá más adelante, utilizando estos criterios para definir un cluster, El 71% de las cepas iniciales (46/65) de *M. abscessus* presentan un patrón único por WGS mientras que el 29% (19/65) están agrupadas en siete clústers (clusters IV, V, VI, VIII, XIV, XVI y XVII). Analizando por subespecie, de las 47 cepas iniciales de *M. abscessus* subsp. *abscessus* el 72% (34/47) presentan un patrón único por WGS mientras que el 28% (13/47) están agrupadas en cinco clústers (clusters IV, V,

VI, VIII y XVI). De las 15 cepas iniciales de *M. abscessus* subsp. *massiliense* el 60% (9/15) presentan un patrón único por WGS mientras que el 40% (6/15) están agrupadas en dos clústers (clusters XIV y XVII). Finalmente las tres cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* presentan un patrón único.

Las cepas iniciales de Barcelona se agrupan por WGS en 20 cepas (60,6%) con perfil único y 13 (39,4%) cepas formando 4 clusters (cluster V formado por 5 ABS; cluster VI, formado por 2 ABS; cluster XVI, formado por 2 ABS; y cluster XVII, formado por 4 MAS). La capacidad discriminativa (Índice de Diversidad de Simpson) de la WGS es de 0,034 usando las 33 cepas de Barcelona.

Además, generamos un árbol de máxima similitud con los *reads* mapeados a la cepa de referencia ATCC19977 con todos los primeros aislamientos de Barcelona y de Londres para observar las diferentes agrupaciones entre cepas de lugares geográficamente distantes.

La imagen muestra la distribución de las cepas del complejo *M. abscessus* en 3 ramas bien diferenciadas. La rama superior corresponde con las cepas de la subespecie *M. abscessus* subsp. *abscessus*, la rama central agrupa las cepas de la subespecie *M. abscessus* subsp. *bolletii*, y la rama inferior corresponde a las cepas de la subespecie *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

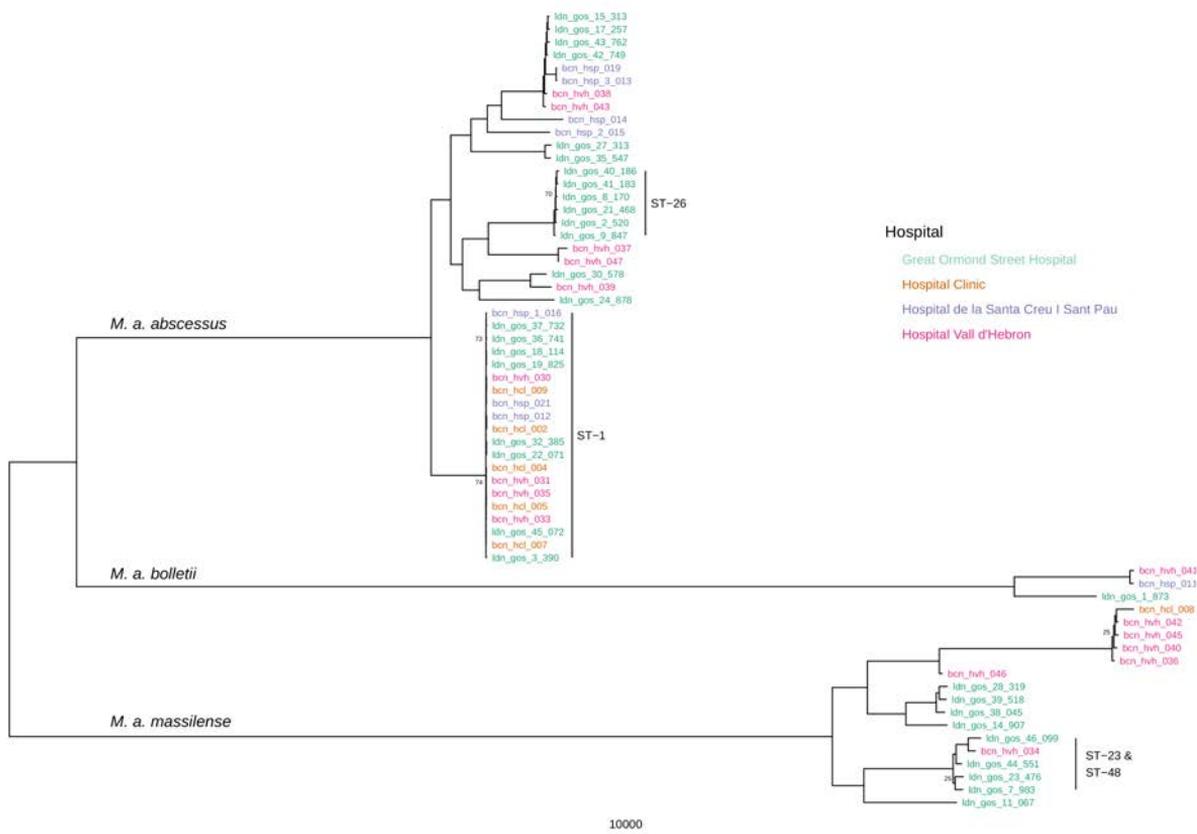
Se observa como cepas de ambas localizaciones geográficas y de diferentes hospitales se agrupan en las mismas ramas con muy pocas diferencias. Además, también observamos como las

cepas que por MLST pertenecen al mismo cluster se agrupan en las mismas ramas.

A igual que con VNTR y MLST la WGS agrupa cepas de diferentes hospitales y ciudades.

Dado que como se ha comentado, la deriva genética de las subespecies y agrupaciones es diferente, hemos analizado por separado las distintas agrupaciones.

**Figura 32.** Distribución de los primeros aislamientos del complejo *M. abscessus* de Londres y Barcelona.



Árbol de máxima similitud basado en las SNVs generado a partir del mapeado de los *reads* al genoma de referencia de *M. abscessus* ATCC19977. Únicamente se utilizó el primer aislamiento por cada paciente. El nombre de las muestras está resaltado del color del hospital en dónde se aisló.

\* Las abreviaciones son: GOS, para Great Ormond Street Hospital, Londres; HCL, para Hospital Clínic, Barcelona; HSP, para Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; y HVH, para Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona. La barra de escala indica el número de sustituciones por cada sitio y los valores de *bootstrap* de los nodos se muestran si están por debajo de 75.

### **5.3.1.6.3. Análisis de las cepas ST-1 de *M. abscessus* subsp. *abscessus***

Las cepas con el perfil de MLST ST-1 forman la agrupación más extensa de cepas de *M. abscessus* de diferentes pacientes y hospitales en nuestro estudio. Recuérdese por otra parte que MLST-1 está geográficamente ampliamente distribuido. El subárbol para el estudio de las cepas ST-1 está formado por 45 cepas de 20 pacientes.

En la imagen de la figura 33 se pueden observar nueve clusters y cinco cepas que no se agrupan en clusters. Cuatro de estos nueve clusters están formados por cepas de diferentes pacientes (Cluster IV, V, VI, VIII), mientras que los cinco restantes están formados por aislamientos repetidos del mismo paciente por lo que no se analizarán.

Los clusters IV y VI están formados, cada uno de ellos, por dos cepas aisladas en Barcelona de pacientes atendidos en hospitales distintos. El cluster VIII está formado por las cepas de dos pacientes del mismo hospital de Londres. El cluster V está formado por cinco cepas de cinco pacientes de Barcelona. Tres de ellas se aislaron de pacientes del HVH y las otras dos de pacientes del HC. A pesar de ser atendidos en el mismo hospital, estos pacientes no hubo coincidencia temporal en el hospital.

#### **I. Cluster IV del subárbol ST-1**

El cluster IV está formado por la cepa de un paciente del HSP (bcn-hsp-012) y la cepa de un paciente del HCL (bcn-hcl-002) de Barcelona. El análisis por WGS sugiere que estas dos cepas

de *M. abscessus* subsp. *abscessus* están muy estrechamente relacionadas a nivel de *core genome* y podrían formar parte de una cadena de transmisión. Pero el estudio epidemiológico de campo no apoya esa posible cadena de transmisión interhumana ya que las cepas fueron aisladas con un intervalo de cinco años en hospitales diferentes: la cepa bcn-hcl-002 fue aislada en 2008 en el hospital de la Santa Creu i Sant Pau, mientras que la cepa bcn-hcl-002 fue aislada en 2013 en el hospital Clínic de Barcelona. No existe pues una relación epidemiológica entre los pacientes de los que se aislaron estas cepas.

## **II. Cluster V del subárbol ST-1**

El cluster V está formado por cinco cepas aisladas de pacientes de dos hospitales de Barcelona. Dos cepas se aislaron en el HCL (bcn-hcl-004, en 2013; y bcn-hcl-005, en 2014) y tres cepas se aislaron en el HVH (bcn-hvh-031, en 2009; bcn-hvh-033, en 2013; y bcn-hvh-035, en 2014). De nuevo, observamos como cepas de diferentes hospitales aisladas con intervalos superiores a un año tienen una muy estrecha relación a nivel de *core genome*. De igual forma que en el análisis anterior, el estudio de epidemiología de campo no sugiere ninguna relación epidemiológica entre los pacientes.

Además se observan diferencias marcadas a nivel del genoma accesorio. La cepa bcn-hvh-035 muestra una ausencia de genes en el genoma accesorio presentes en las demás cepas, y la cepa bcn-hvh-031 presenta un *cassette* de genes en el genoma accesorio ausente en las demás cepas del cluster.

También se observan diferencias en el perfil de VNTR en las cepas bcn-hvh-031 y bcn-hvh-033. Ambas cepas tienen un perfil de VNTR único. Para explicar por qué la técnica de VNTR puede ser, en ocasiones, más discriminativa que la WGS, hemos de tener en cuenta que, según nuestros criterios de comparación de cepas, la WGS sólo analiza las secuencias compartidas por las distintas cepas. Cuando, por ejemplo, en un *locus* de VNTR una cepa presenta tres repeticiones y otra dos, solo se compararán las dos repeticiones compartidas. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores [137,225-227].

### **III. Cluster VI del subárbol ST-1**

El cluster VI está formado por dos cepas de dos pacientes de Barcelona. La cepa bcn-hcl-009 fue aislada en el HCL en 2013 y la cepa bcn-hvh-030 fue aislada en el HVH en 2012. Así pues, no encontramos una relación epidemiológica plausible para poder establecer una cadena de transmisión interhumana.

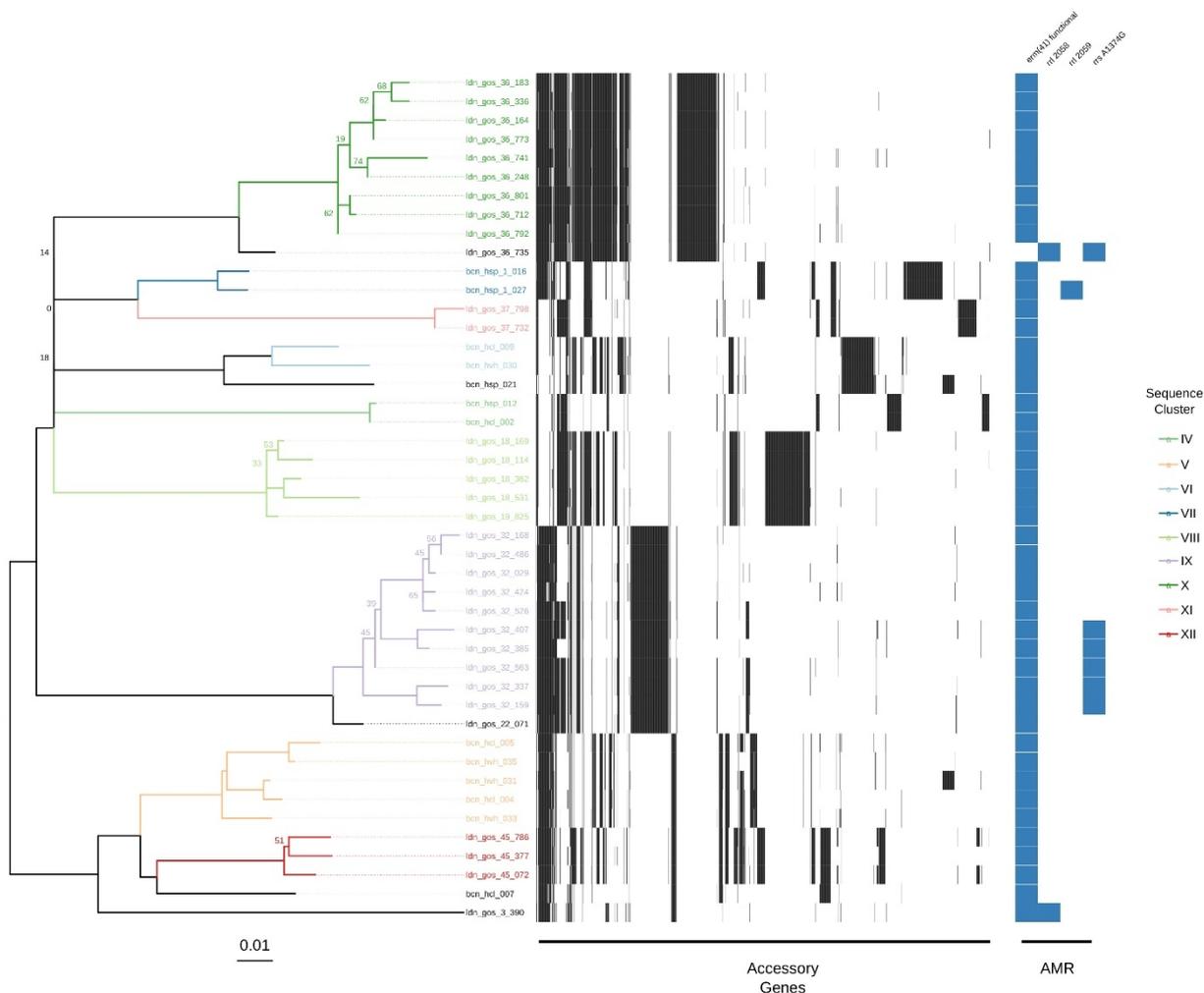
### **IV. Cluster VIII del subárbol ST-1**

El cluster VIII está formado por cinco cepas de dos pacientes del hospital Great Ormond Street de Londres. Cuatro de las cinco cepas corresponden al paciente ldn-gos-18 y una cepa corresponde al paciente ldn-gos-19. Estos dos pacientes sí tienen una relación epidemiológica ya que son hermanos y comparten vivienda [139].

En este sentido, el cluster VIII es el único en el que existe una relación epidemiológica clara entre los pacientes agrupados. No obstante, como bien ellos argumentan en su estudio, no

podemos confirmar la transmisión de paciente a paciente porque los pacientes pudieron contagiarse de la misma cepa ambiental de la misma fuente. Al compartir casa han estado expuestos a los mismos focos. En nuestro estudio, estas dos cepas son las únicas que están agrupadas por WGS y epidemiológicamente están relacionadas.

**Figura 33.** Árbol de máxima similitud de las cepas pertenecientes al primer cluster (Cluster ST-1).



\* Árbol de máxima similitud basado en las SNVs generado a partir del mapeado de los *reads* al genoma de referencia de *M. abscessus* ATCC19977. Las muestras están resaltadas según su pertenencia a cada subcluster. El árbol está anotado con la presencia (en negro) y ausencia (en blanco) de los genes del genoma accesorio. Además también se ha anotado la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia antibiótica (AMR) de los genes *rrl*, *erm(41)* y *rrs*. La barra de escala indica el número de sustituciones por cada sitio y los valores de *bootstrap* de los nodos se muestran si están por debajo de 75.

#### **5.3.1.6.4. Análisis de las cepas ST-26 de *M. abscessus* subsp. *abscessus***

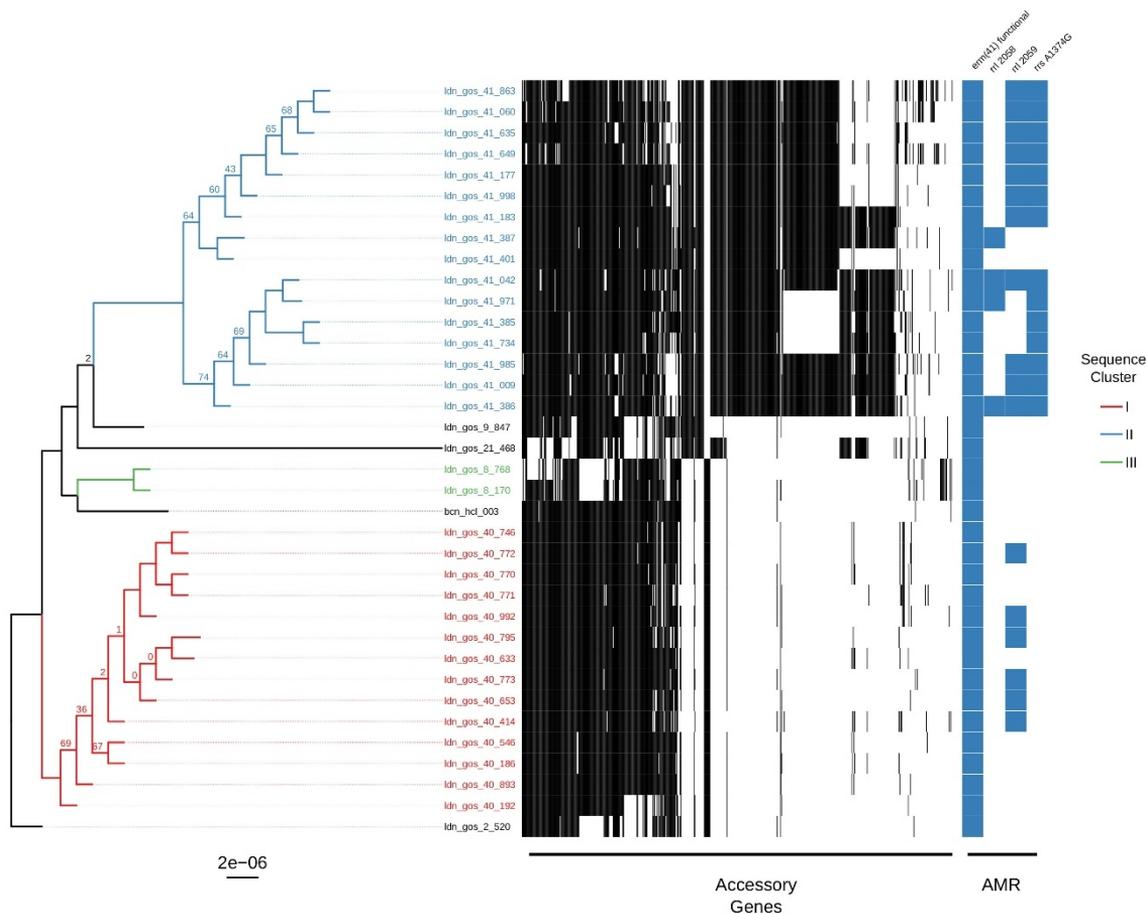
El análisis por WGS de las cepas agrupadas en el ST-26 por MLST se ha realizado igual que el análisis del cluster ST-1 pero sustituyendo el genoma de referencia de *M. abscessus* ATCC19977 por el genoma ensamblado *de novo* de la cepa ldn\_gos\_2\_520 perteneciente a este cluster.

En la imagen de la figura 34 observamos que la WGS define tres clusters y cuatro cepas independientes. Los clusters están formados por cepas del mismo paciente por lo que no constituyen agrupaciones epidemiológicas. Es decir, todas las cepas del ST-26 tendrían un patrón único.

A pesar de ello, es interesante comentar que se observan diferencias a nivel del genoma accesorio entre las cepas de un mismo paciente (ldn-gos-41). El observar estas diferencias en el genoma accesorio del mismo paciente plantea la existencia de subpoblaciones dentro de la infección por *M. abscessus*. El estudio realizado por Shaw y col. [228] muestra la diversidad genética de las cepas aisladas en diferentes zonas del mismo paciente. En los distintos focos de infección el microorganismo puede evolucionar de forma diferente adquiriendo mutaciones que den lugar a patrones de sensibilidad distintos.

**Figura 34.** Árbol de máxima similitud de las cepas pertenecientes al segundo cluster (Cluster ST-26).

\*Árbol de máxima similitud basado en las SNVs generado a partir del



mapeado de los *reads* al genoma ensamblado *de novo* del primer aislamiento de una cepa perteneciente a este cluster (*Idn\_gos\_2\_520*). Las muestras están resaltadas según su pertenencia a cada subcluster. El árbol está anotado con la presencia (en negro) y ausencia (en blanco) de los genes del genoma accesorio. Además también se ha anotado la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia antibiótica (AMR) de los genes *rrl*, *erm(41)* y *rrs*. La barra de escala indica el número de sustituciones por cada sitio y los valores de *bootstrap* de los nodos se muestran si están por debajo de 75.

### **5.3.1.6.5. Análisis del subarbol ST-23 y ST-48 de *M. abscessus* subsp. *massiliense***

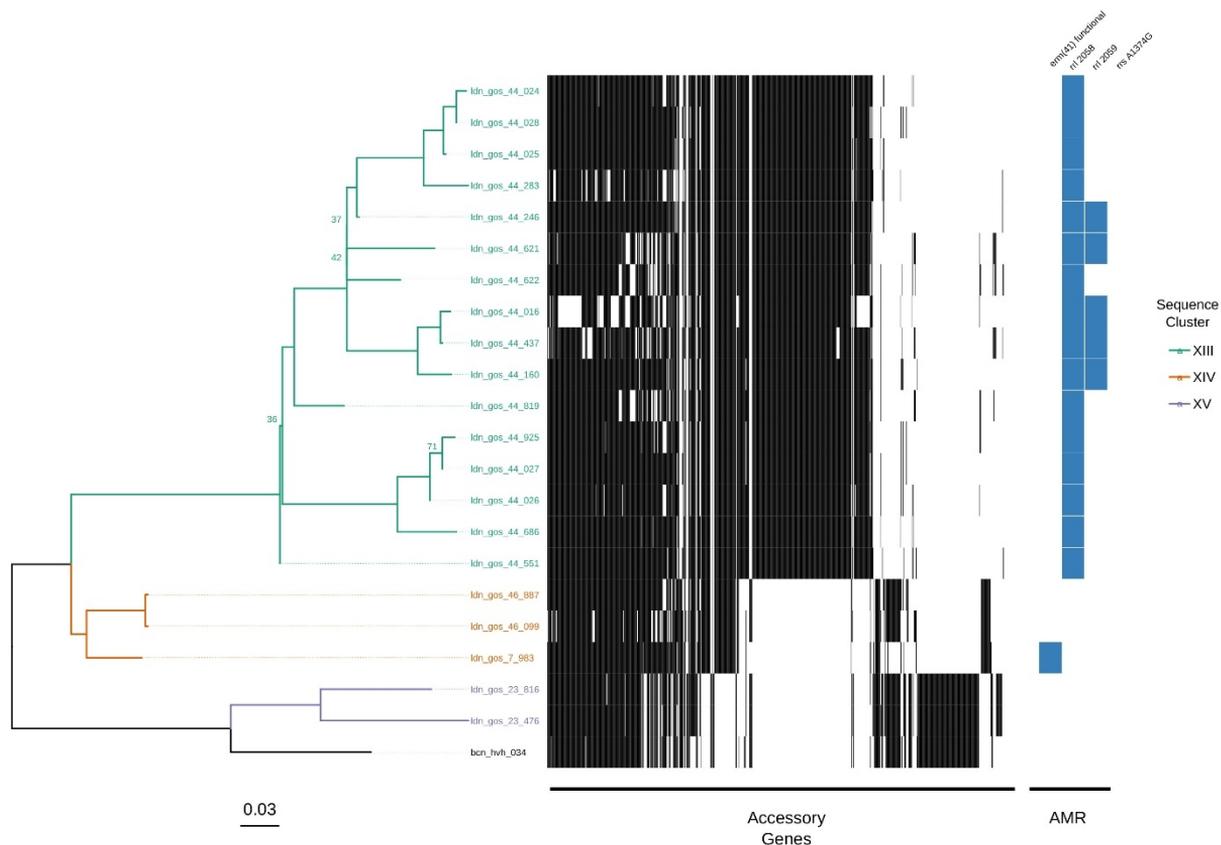
El análisis por WGS de la rama de los clusters ST-23 y ST-48 determinados por MLST se ha realizado igual que el análisis de los clusters ST-1 y ST-26 pero sustituyendo el genoma de referencia al que hemos mapeado las cepas por el genoma de la cepa de referencia de *M. abscessus* subsp. *massiliense* GO 06.

En la imagen de la figura 36 observamos como los clusters ST-23 y ST-48 también se separan bien cuando mapeamos los *reads* a la secuencia de referencia *M. abscessus* subsp. *massiliense* GO 06.

Los dos clusters definidos por MLST se diferencian en tres clusters por WGS y una cepa independiente. El cluster XIII está formado por las cepas de un único paciente aisladas en el GOS que pertenecen al ST-23. El cluster XIV está formado por tres cepas del ST-23 que pertenecen a dos pacientes diferentes (46 y 7) y fueron aisladas con varios años de diferencia. El cluster XV está formado por dos cepas aisladas del mismo paciente y pertenecen al ST-48. La cepa con patrón único por WGS tiene el ST-48.

Esto es, de los tres clusters detectados por WGS, dos están formados por cepas del mismo paciente y uno por cepas de dos pacientes del mismo hospital pero sin coincidencia en el tiempo. Por ello, de nuevo, las agrupaciones detectadas por WGS no parecen corresponder a cadenas de transmisión interhumanas cuando se añaden los datos de la epidemiología de campo.

**Figura 35.** Árbol de máxima similitud de las cepas pertenecientes al tercer cluster (Cluster ST-23 y ST-48).



\* Árbol de máxima similitud basado en las SNVs generado a partir del mapeado de los *reads* al genoma de la cepa de referencia de *M. abscessus* subsp. *massiliense* GO 06. Las muestras están resaltadas según su pertenencia a cada subcluster. El árbol está anotado con la presencia (en negro) y ausencia (en blanco) de los genes del genoma accesorio. Además también se ha anotado la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia antibiótica (AMR) de los genes *rrl*, *erm(41)* y *rrs*. La barra de escala indica el número de sustituciones por cada sitio y los valores de *bootstrap* de los nodos se muestran si están por debajo de 75.

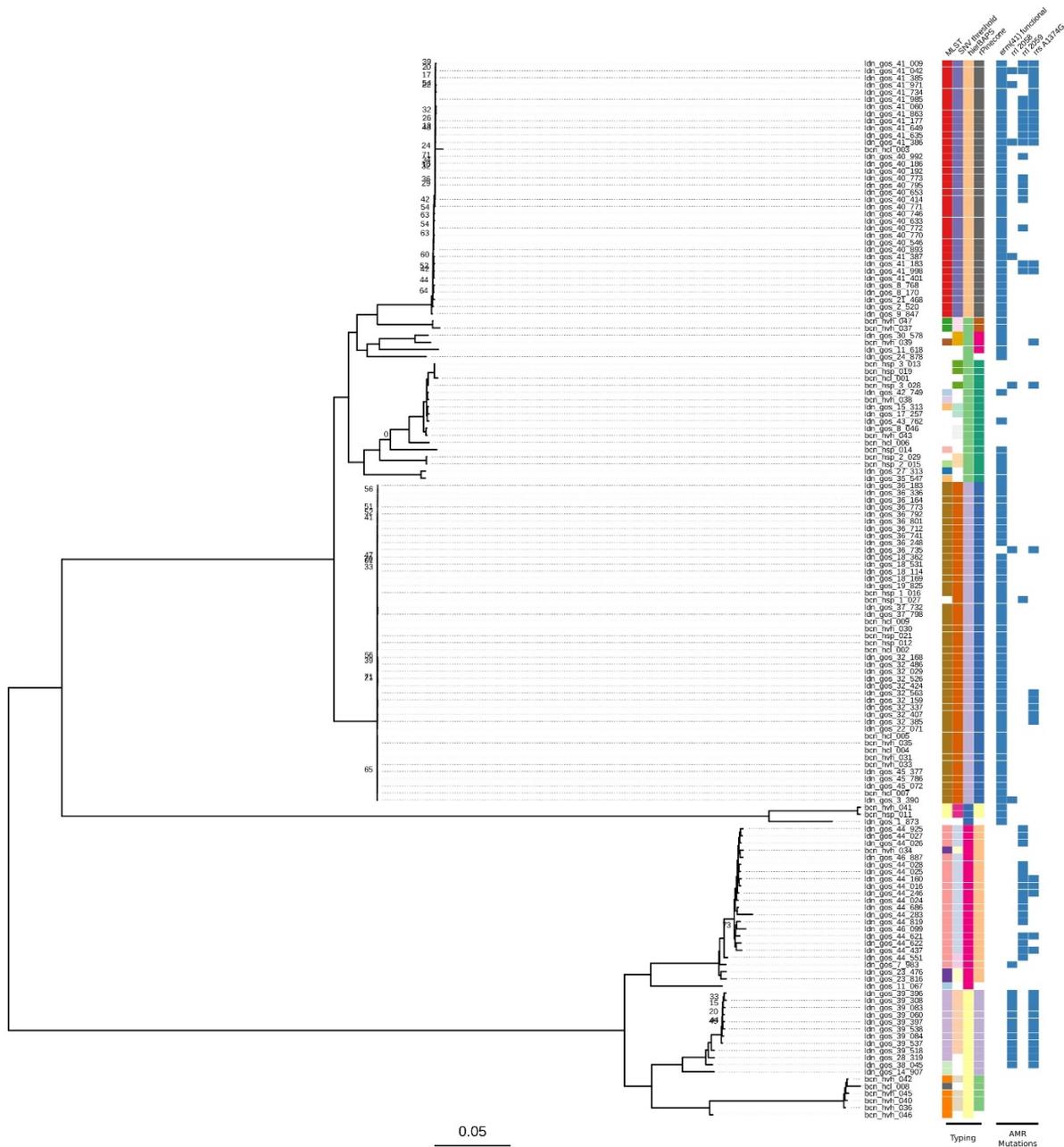
### **5.3.1.6.6. Análisis de los clusters detectados por MLST en Barcelona ( *M. abscessus* subsp. *massiliense* ST-34 y *M. abscessus* subsp. *abscessus* ST-22)**

El hecho de disponer de pocas cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* del ST-34 y de *M. abscessus* subsp. *abscessus* del ST-22 hace imposible crear un subárbol con suficiente significación para poder analizar los resultados como en los clusters anteriores. Por eso hemos utilizado el análisis con todas las cepas suplementado con los datos obtenidos por MLST, nuestro *script* y la herramienta rPinecone. En la imagen de la figura 36 observamos los clusters generados utilizando MLST, el *script* que utiliza el umbral de SNPs y rPinecone. La imagen muestra todas las cepas de Londres y Barcelona.

Las cepas bcn\_hvh\_042, bcn\_hvh\_045, bcn\_hvh\_040 y bcn\_hvh\_046 corresponden a las cuatro cepas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* aislados en el HVH en Barcelona y pertenecientes al ST34. Todos los métodos para inferir la posible transmisión entre pacientes utilizados agrupan estas 4 cepas en el mismo cluster con muy pocas diferencias. Pero al comprobar los datos de los pacientes de los que se aislaron estas cepas no hemos podido establecer una relación epidemiológica temporo-espacial. Aunque las 4 cepas fueron aisladas en el mismo hospital, fueron aisladas con al menos un año de diferencia y en departamentos diferentes. No obstante, no podemos descartar que los pacientes se hayan infectado de la misma fuente, puesto que una de las limitaciones de este estudio es la falta de muestras ambientales.

El cluster ST-22 determinado por MLST está formado por dos cepas de *M. abscessus* subsp *abscessus* aisladas en el hospital HVH (bcn-hvh-037 y bcn-hvh-047). Estas dos cepas también tienen el mismo perfil de VNTR (Cluster III). Utilizando el análisis de WGS observamos como la cepa bcn-hvh-037 tiene un importante número de diferencias con la cepa bcn-hvh-047. Además, los resultados del análisis del árbol hecho por rPinecone y el *script* para separar por el umbral de SNPs no las agrupan en ningún cluster. Por tanto, estas dos cepas que por MLST y VNTR mostraban una estrecha relación, por WGS se ha demostrado que existen diferencias suficientes para no agruparlas en un mismo cluster que pueda ser considerado como una posible cadena de transmisión interhumana.

**Figura 36.** Árbol de máxima similitud a partir de SNVs de todas las muestras.



El árbol está anotado con las agrupaciones de los clusters generados por el MSLT, el umbral de SNPs, rPinecone y hierBAPS, así como la presencia de gens de resistencia.

### **5.3.1.7. Resultados de la combinación de todos los marcadores moleculares**

La tabla 33 muestra los resultados de la combinación de todas las técnicas. En resumen, nuestros resultados con WGS muestran cepas aisladas en el mismo hospital de diferentes pacientes y aisladas de pacientes atendidos en hospitales diferentes con menos diferencias de SNPs que las cepas aisladas de un mismo paciente y por lo tanto se agrupan en un cluster por WGS. Por otra parte, también hemos observado como WGS tiene mayor poder discriminativo que MLST o VNTR ya que separa algunas cepas que estaban agrupadas por estos marcadores (tablas 31 y 32). La capacidad discriminativa del VNTR es de 0,045, del MLST de 0,145, y del WGS de 0,034. Cuando definimos la agrupación asociando a los tres marcadores (tabla 33), el 77% de las cepas iniciales (50 de 65) tienen un perfil único y el 23% de las cepas (15 de 65) están agrupadas en seis clusters, de los cuales, cuatro son de la subespecie *M. abscessus* subsp. *abscessus* (el cluster I que agrupa tres cepas; el cluster II que agrupa dos cepas; el cluster III que agrupa dos cepas; y el cluster V que agrupa dos cepas), y dos son de la subespecie *M. abscessus* subsp. *massiliense* (el cluster IV que agrupa dos cepas y el cluster VI que agrupa cuatro cepas).

En referencia a los resultados obtenidos por el análisis de WGS, hemos observado como el establecer un umbral de corte con un número fijo SNPs no es el mejor método para establecer las agrupaciones de cepas. La deriva genética de las tres

subespecies e incluso de las diferentes agrupaciones es distinta. Estas diferencias han sido también observadas por Davidson y col. [135]. El uso de datos del genoma accesorio permite ver algunas diferencias entre cepas que se agrupan a nivel de core-genome.

En el estudio de David y col. de 2016 [223], observan como los clones de *L. pneumophilla* pueden mostrar diferentes escalas de diversidad genética con lo que el uso de un mismo umbral con un número fijo de diferencia de SNPs no tiene el suficiente poder de discriminación para inferir la transmisión. En relación con *M. abscessus*, se ha intentado establecer un umbral de corte absoluto de menos de 25-30 SNPs de diferencia para inferir la relación entre las cepas [32,138,229]. Con nuestros resultados, creemos que la utilización de un genoma de referencia único para todo el complejo (*M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977) puede enmascarar las diferencias entre cepas que pertenecen a otro cluster o a otra subespecie. Nosotros creemos que la forma óptima de efectuar el análisis es utilizar un genoma de referencia lo más próximo posible a las cepas agrupadas. En el caso de no existir un genoma de referencia del mismo cluster estudiado, en nuestro caso, recomendamos la utilización de un genoma ensamblado de novo de buena calidad de una cepa perteneciente a ese cluster como referencia para mapear las demás cepas.

**Tabla 33 (Parte 1).** Resumen de las diferentes técnicas para el estudio de la epidemiología del complejo *M. abscessus*.

Cepa	Paciente	Hospital	Subespecie	VNTR	MLST	Úmbral de SNV	rPinecone	Perfil combinado
ldn_gos_2_520	49	GOS	ABS		ST-26	I	Único	Único
ldn_gos_40_186	64	GOS	ABS		ST-26	I	Único	Único
ldn_gos_41_009	65	GOS	ABS		ST-26	Único	Único	Único
ldn_gos_9_847	73	GOS	ABS		ST-26	Único	Único	Único
bcn_hsp_012	9	HSP	ABS	Único	ST-1	IV	IV	Único
bcn_hcl_002	18	HCL	ABS	Único	ST-1	IV	IV	Único
ldn_gos_22_071	51	GOS	ABS		ST-1	IX	Único	Único
ldn_gos_32_029	58	GOS	ABS		ST-1	IX	Único	Único
bcn_hcl_004	20	HCL	ABS	II	ST-1	V	V	Cluster I
bcn_hcl_005	21	HCL	ABS	II	ST-1	V	V	Cluster I
bcn_hvh_035	30	HVH	ABS	II	ST-1	V	V	Cluster I
bcn_hvh_033	28	HVH	ABS	Único	ST-1	V	V	Único
bcn_hvh_031	27	HVH	ABS	Único	ST-1	V	V	Único
bcn_hcl_009	25	HCL	ABS	II	ST-1	VI	VI	Cluster II
bcn_hvh_030	26	HVH	ABS	II	ST-1	VI	VI	Cluster II
bcn_hsp_016	3	HSP	ABS	Único	ST-1	Único	Único	Único
ldn_gos_18_114	47	GOS	ABS		ST-1	VIII	VIII	Cluster III
ldn_gos_19_825	48	GOS	ABS		ST-1	VIII	VIII	Cluster III
ldn_gos_36_164	60	GOS	ABS		ST-1	Único	Único	Único
ldn_gos_37_732	61	GOS	ABS		ST-1	Único	Único	Único
ldn_gos_45_072	69	GOS	ABS		ST-1	Único	Único	Único
ldn_gos_44_016	68	GOS	MAS		ST-23	Único	Único	Único
ldn_gos_46_099	70	GOS	MAS		ST-23	XIV	XIV	Cluster IV
ldn_gos_7_983	71	GOS	MAS		ST-23	XIV	XIV	Cluster IV
bcn_hsp_015	2	HSP	ABS	Único	ST-14	Único	Único	Único
ldn_gos_23_476	52	GOS	MAS		ST-48	Único	Único	Único
bcn_hsp_013	1	HSP	ABS	I	ST-1	XVI	XVI	Cluster V
bcn_hsp_019	14	HSP	ABS	I	ST-1	XVI	XVI	Cluster V
bcn_hvh_036	31	HVH	MAS	IV	ST-34	XVII	XVII	Cluster VI
bcn_hvh_040	35	HVH	MAS	IV	ST-34	XVII	XVII	Cluster VI
bcn_hvh_042	37	HVH	MAS	IV	ST-34	XVII	XVII	Cluster VI
bcn_hvh_045	39	HVH	MAS	IV	ST-34	XVII	XVII	Cluster VI

\* Abreviaciones: ABS, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, *M. abscessus* subsp. *bolletii*; MAS, *M. abscessus* subsp. *massiliense*; GOS, Hospital Great Ormond Street; HSP, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; HCL, Hospital Clínic de Barcelona; HVH, Hospital de la Vall d'Hebron. Los números de las columnas del umbral de SNV y de rPinecone corresponde a los clusters generados por los programas. Las filas en rojo corresponden con cepas que quedan agrupadas en todos los análisis.

**Tabla 33 (Parte 2).** Resumen de las diferentes técnicas para el estudio de la epidemiología del complejo *M. abscessus*.

Cepa	Paciente	Hospital	Subespecie	VNTR	MLST	Úmbra l de SNV	rPinecone	Resultado combinado
ldn_gos_39_060	63	GOS	MAS		ST-37	Único	Único	Único
bcn_hsp_021	16	HSP	ABS	Único	ST-1	Único	Único	Único
bcn_hcl_007	23	HCL	ABS	II	ST-1	Único	Único	Único
ldn_gos_3_390	56	GOS	ABS		ST-1	Único	Único	Único
bcn_hcl_008	24	HCL	MAS	Único	ST-115	Único	Único	Único
ldn_gos_11_067	43	GOS	MAS		ST-117	Único	Único	Único
ldn_gos_27_313	54	GOS	ABS		ST-122	Único	Único	Único
bcn_hvh_037	32	HVH	ABS	III	ST-22	Único	Único	Único
bcn_hvh_047	41	HVH	ABS	III	ST-22	Único	Único	Único
bcn_hcl_003	19	HCL	ABS	Único	ST-26	Único	Único	Único
ldn_gos_21_468	50	GOS	ABS		ST-26	Único	Único	Único
ldn_gos_15_313	45	GOS	ABS		ST-33	Único	Único	Único
ldn_gos_35_547	59	GOS	ABS		ST-33	Único	Único	Único
bcn_hvh_046	40	HVH	MAS	Único	ST-34	Único	Único	Único
ldn_gos_28_319	55	GOS	MAS		ST-37	Único	Único	Único
bcn_hvh_034	29	HVH	MAS	Único	ST-48	Único	Único	Único
bcn_hsp_011	5	HSP	BOL	V	ST-52	Único	Único	Único
bcn_hvh_041	36	HVH	BOL	V	ST-52	Único	Único	Único
bcn_hvh_039	34	HVH	ABS	Único	ST-58	Único	Único	Único
bcn_hsp_014	13	HSP	ABS	Único	ST-61	Único	Único	Único
ldn_gos_42_749	66	GOS	ABS		ST-63	Único	Único	Único
ldn_gos_14_907	44	GOS	MAS		ST-69	Único	Único	Único
ldn_gos_38_045	62	GOS	ABS		ST-69	Único	Único	Único
bcn_hvh_038	33	HVH	ABS	Único	ST-77	Único	Único	Único
bcn_hcl_001	17	HCL	ABS	Único	ST-I	Único	Único	Único
bcn_hcl_006	22	HCL	ABS	Único		Único	Único	Único
bcn_hvh_043	38	HVH	ABS	Único		Único	Único	Único
ldn_gos_1_873	42	GOS	BOL			Único	Único	Único
ldn_gos_17_257	46	GOS	ABS			Único	Único	Único
ldn_gos_24_878	53	GOS	ABS			Único	Único	Único
ldn_gos_30_578	57	GOS	ABS			Único	Único	Único
ldn_gos_43_762	67	GOS	ABS			Único	Único	Único
ldn_gos_8_046	72	GOS	ABS			Único	Único	Único

\* Abreviaciones: ABS, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, *M. abscessus* subsp. *bolletii*; MAS, *M. abscessus* subsp. *massiliense*; GOS, Hospital Great Ormond Street; HSP, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; HCL, Hospital Clínic de Barcelona; HVH, Hospital de la Vall d’Hebron.. Los números de las columnas del úmbra l de SNV y de rPinecone corresponde a los clusters que los programas han generado.

### **5.3.1.8. Consideraciones sobre los marcadores moleculares**

Al analizar estas agrupaciones con los datos de epidemiología de campo, solo una de las agrupaciones (las dos cepas que fueron aisladas de dos hermanos) tiene datos consistentes con una infección simultánea, sea por transmisión interhumana o por una infección independiente y simultánea a partir de la misma cepa ambiental. En las demás agrupaciones existen diferencias en el espacio o en el tiempo. Como se ha comentado, una de las limitaciones de este trabajo es no disponer de cepas ambientales del entorno de los pacientes. Cabe la posibilidad de que los pacientes agrupados se hayan infectado por la misma cepa ambiental (en el hospital o fuera de el) que persista en este ambiente a lo largo del tiempo.

Es interesante destacar que así como por VNTR y MLST existen cepas agrupadas de enfermos alejados en el espacio puesto que provienen de ciudades y países distintos, este hecho no se da en el análisis por WGS ya que las cepas agrupadas han sido aisladas en Barcelona o Londres pero no en ambas ciudades.

Cuando una infección tiene un reservorio humano exclusivo y por tanto una transmisión interhumana (a partir de enfermos o portadores), sabemos que los marcadores moleculares tradicionales permiten descartar la transmisión cuando los patrones obtenidos son distintos (*rule out*), pero no permiten afirmar la transmisión cuando los patrones observados son iguales (*rule in*). Para confirmar esta transmisión de cepas agrupadas se precisan de datos de epidemiología de campo

que reflejen una coincidencia en el tiempo y en el espacio de los pacientes.

En el caso de *M. abscessus*, el reservorio es ambiental. Los pacientes se contagian a partir de este reservorio ambiental. Por ello, si existen clones ambientales persistentes, no es necesaria la coincidencia temporal entre los pacientes para establecer una cadena de transmisión a partir de este reservorio. Dado que este reservorio ambiental a partir del que se contagian los pacientes puede situarse en el hospital o fuera de él, en sentido estricto tampoco es necesaria una coincidencia en el mismo hospital entre los pacientes agrupados.

Tal como se ha comentado, una de las limitaciones de esta tesis es que no se ha realizado un estudio del ambiente para conocer la dinámica de *M. abscessus* en su ecosistema natural. Esto es, ¿existen en el ambiente clones globales y persistentes en el tiempo?. Si esto es así, ¿han contactado los pacientes agrupados con este ambiente aunque sea en tiempos distantes?. Para que dos pacientes que se pongan en contacto con una cepa ambiental en tiempos distantes presenten una infección por la misma clona, la deriva genética de esta cepa ambiental en su ecosistema ha de ser mínima.

No sabemos si aislamos cepas pertenecientes al mismo clon porque es un clon mayoritario en el ambiente, es un clon más especializado en la infección a humanos o es un clon capaz de transmitirse entre pacientes [135].

Por otra parte, la WGS ha permitido detectar en un enfermo la existencia de subpoblaciones con un patrón de sensibilidad distinto.

Actualmente, existe el debate de la transmisión interhumana de *M. abscessus*. Nuestros resultados no muestran una cadena de transmisión interhumana.

### **5.3.2. Análisis de las cepas obtenidas en el seguimiento de un paciente con infección crónica mediante marcadores moleculares**

En nuestro estudio disponemos de 12 cepas pertenecientes a cuatro pacientes. Cuatro cepas pertenecen al paciente 1 separadas en el tiempo de aislamiento por tres años las tres primeras y con más de un año entre la tercera y la última; cuatro cepas pertenecen al paciente 2 separadas en el tiempo de aislamiento por dos años entre la primera y la segunda, nueve meses entre la segunda y la tercera, y cuatro años entre la tercera y la última; dos cepas pertenecen al paciente 3 separadas en el tiempo de aislamiento por dos años; y dos cepas pertenecientes al paciente 4 separadas en el tiempo de aislamiento por un año. Para determinar la persistencia de la infección por el mismo clon de *M. abscessus* en el mismo paciente, y descartar una reinfección, utilizamos el análisis de perfiles de VNTR.

La tabla 34 muestra los resultados del análisis de los perfiles de VNTR de los 4 pacientes. En la tabla se puede observar como los perfiles de los 4 pacientes son diferentes entre ellos y todos los aislamientos del mismo paciente tienen el mismo perfil. Estos resultados sugieren que los diferentes aislamientos de un mismo paciente pertenecen a la misma cepa y no ha habido reinfección por otra cepa diferente.

Por otra parte, se observa la selección durante el tratamiento de mutaciones de resistencia a los macrólidos (gen *rrl* A2058G,

A2057G y A2059G) en tres pacientes y a los aminoglicósidos en uno (gen *rrs* A1408G).

**Tabla 34.** Análisis de las cepas de seguimiento de 4 pacientes de Barcelona

Paciente	Identificador	Subespecie	Fecha de aislamiento	Perfil de VNTR	Perfil	<i>rrl</i>	<i>erm(41)</i>	<i>rrs</i>
1	bcn-hsp-013	ABS	05/06/2007	42423335332426232	I	wt	28C	wt
1	10I281 <sup>A</sup>	ABS	24/10/2010	233242	I	A2058G	28C	N/D
1	13I330 <sup>A</sup>	ABS	08/10/2013	233242	I	A2058G	28C	N/D
1	bcn-hsp-028	ABS	30/06/2014	42423335332426232	I	A2058G	28C	A1408G
2	bcn-hsp-015	ABS	24/03/2009	321223311034121423	II	wt	28T	wt
2	11I110 <sup>A</sup>	ABS	23/02/2011	223414	II	wt	28T	N/D
2	11I441 <sup>A</sup>	ABS	12/12/2011	223414	II	A2057G/A2057 <sup>B</sup>	28T	N/D
2	bcn-hsp-029	ABS	01/12/2015	321223311034121423	II	wt	28T	wt
3	bcn-hsp-016	ABS	17/09/2009	63224432334342432	III	wt	28T	wt
3	bcn-hsp-027	ABS	05/07/2011	63224432334342432	III	A2059G	28T	wt
4	04I462 <sup>A</sup>	BOL	22/12/2004	221322	IV	wt	28T	N/D
4	05I586 <sup>A</sup>	BOL	24/11/2005	221322	IV	wt	28T	N/D

La tabla muestra los perfiles de VNTR de todas las cepas de seguimiento del complejo *M. abscessus* estudiadas, las agrupaciones por VNTR y el gen asociado a la adquisición de resistencia a los macrólidos (el gen *rrl* y el gen *erm(41)*) y a los aminoglucósidos (el gen *rrs*).

\* Las abreviaciones son: ABS, *M. abscessus* subsp. *abscessus*; BOL, *M. abscessus* subsp. *bolletii*; MAS, *M. abscessus* subsp. *massiliense*; N/D, no determinado.

<sup>A</sup> Cepas en que únicamente se estudiaron los seis alelos descritos por Wong (TR45, TR109, TR116, TR150, TR155 y TR172) para su análisis de VNTR [143].

<sup>B</sup> Doble pico en la secuencia de ADN.





## **6.CONCLUSIONS**



1. The sequencing consensus of four housekeeping genes allows the identification of *M. abscessus* complex to the subspecies level.
2. There is horizontal gene transfer between the subspecies of the *M. abscessus* complex. We observed the horizontal transfer of genes in 15% of our isolates.
3. MALDI-ToF is unable to identify to the subspecies level at present.
4. The majority of *M. abscessus* complex isolates were resistant to trimetoprim-sulfamethoxazole, moxifloxacin, ciprofloxacin, ceftiofur, cefepime, augmentin, ceftazidime, doxycycline and minocycline.
5. The drug susceptibility testing of *M. abscessus* complex isolates using E-test gives higher MICs than the microdilution test for the antibiotics tested.
6. Sixty-four percent of *M. abscessus* complex isolates were resistant to clarithromycin and inducible resistance, due to a complete functional *erm(41)* gene, was observed in the majority of *M. abscessus* subsp *abscessus* strains and *M. abscessus* subsp *bolletii*. Constitutive resistance was due to a single nucleotide polymorphism in the position 2057, 2058 or 2059 in the *rrl* gene.
7. Most strains were sensitive to amikacin. Three strains showed an initial resistance and one strain an acquired resistance. The molecular mechanism of resistance was the mutation A1408G in the *rrs* gene in three of these four strains. Selection of mutations at any position of the S12 ribosomal protein was not observed. All the strains

presented a 2'-N-acetyltransferase that has been described as an innate mechanism of decreased sensitivity of the RGM to the aminoglycosides.

8. The majority of *M. abscessus* complex isolates were resistant to quinolones. Mutations inside the QRDR of the genes *gyrA* and *gyrB* were not observed. There must be other molecular mechanisms of resistance to quinolones in the *M. abscessus* complex.
9. The 24% of *M. abscessus* complex isolates were resistant to linezolid. Mutations in *rrl*, *rplC*, *rplD*, *rplV* genes were not found. Again, there must be other molecular mechanisms of resistance to linezolid in the *M. abscessus* complex.
10. All *M. abscessus* complex isolates were sensitive to tigecycline.
11. Whole Genome Sequencing (WGS) analysis is the most discriminatory technique for molecular epidemiology of the *M. abscessus* complex, followed by the VNTR analysis, and lastly by the MLST analysis.
12. Establishing a WGS threshold with a fixed number of SNPs is not the best method to define clustering across the entire *M. abscessus* complex. This is due to the varying genetic drift seen between three subspecies and even within the same subspecies. The optimal way to perform the analysis is to use a reference genome as close as possible to the clustered strains. In the case of not having a reference genome related to the cluster we recommend the use of a de novo assembled genome of a strain belonging to that cluster as a reference to map the other strains. The use of

accessory genome data allows to detect some differences between strains that may seem identical at the core-genome level.

13. There are predominant circulating clones of *M. abscessus* seen worldwide.
14. When the three markers are associated, 74% of the initial strains have a unique profile and 26% are grouped into seven clusters.
15. Only one cluster (two strains that were isolated from two siblings) has epidemiological data consistent with a simultaneous infection, either by interhuman transmission or by an independent infection from the same environmental strain. In the other clusters there are differences in space and or time. If there are persistent environmental clones, the temporal coincidence of clustered patients should not be necessary.
16. Interhuman transmission has a minor role in *M. abscessus* spread.

## 7. REFERENCIAS

1. Griffith DE, Brown-Elliott B a., Benwill JL, Wallace RJ. Mycobacterium abscessus: «Pleased to meet you, hope you guess my name???» Ann Am Thorac Soc **2015**; 12:436-439.
2. Medjahed H, Gaillard JL, Reyrat JM. Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. Trends Microbiol **2010**; 18:117-123. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.007>.
3. Zelazny AM, Olivier KN. “You Can’t Always Get What You Want...” The *Mycobacterium abscessus* Issue. Name versus Function. Ann Am Thorac Soc **2015**; 12:300-302. Available at: <http://www.atsjournals.org/doi/10.1513/AnnalsATS.201502-087ED>.
4. Bottai D, Stinear TP, Supply P, Brosch R. Mycobacterial Pathogenomics and Evolution. Microbiol Spectr **2014**; :1-19.
5. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. Mungi*. Emerg Infect Dis **2010**; 16:1296-1299.
6. Cousins D V., Bastida R, Cataldi A, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol **2003**; 53:1305-1314.
7. Emmanuel FX, Seagar A, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I. Human and Animal Infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. Emerg Infect Dis **2007**; 13:1924-1927. Available at: [https://www.lesmauxdedos.com/mal-aud-dos/sciatique.html?utm\\_source=Taboola&utm\\_medium=Content-Marketing&utm\\_campaign=Taboola-Sciatique-FR-PR](https://www.lesmauxdedos.com/mal-aud-dos/sciatique.html?utm_source=Taboola&utm_medium=Content-Marketing&utm_campaign=Taboola-Sciatique-FR-PR).
8. Karlson AG, Lessel EF. MYCOBACTERIUM BOVIS NOM. NOV. Int J Syst Bacteriol **1970**; 20:273-282.

9. Parsons SDC, Drewe JA, Pittius NCG Van, Warren RM, Helden PD Van. Novel Cause of Tuberculosis. *Emerg Infect Dis* **2013**; 19:2004-2007.
10. Rodríguez S, Bezos J, Romero B, et al. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg Infect Dis* **2011**; 17:532-535.
11. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, et al. Characterization of *M. orygis* as *Mtbc* subspecies. **2012**; 18:653-655. Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3309669/pdf/11-0888\\_finalD.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3309669/pdf/11-0888_finalD.pdf).
12. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas PEW, et al. A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* **1997**; 47:1236-1245. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-47-4-1236>.
13. Stamm LM, Morisaki JH, Gao L, et al. *Mycobacterium marinum* Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility *The Journal of Experimental Medicine*. **2003**; 198.
14. RUNYON EH. TYPICAL MYOBACTERIA: THEIR CLASSIFICATION. *Am Rev Respir Dis* **1965**; 91:288-289.
15. Kim CJ, Kim NH, Song KH, et al. Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**; 75:73-76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.019>.
16. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev* **2014**; 27:727-752.
17. Moore M, Frerichs JB. An Unusual Acid-Fast Infection of the Knee with Subcutaneous, Abscess-Like Lesions of the Gluteal Region. *J Invest Dermatol* **1953**; 20:133-169. Available at:

18. Lee MR, Sheng WH, Hung CC, Yu CJ, Lee LN, Hsueh PR. Mycobacterium abscessus complex infections in humans. *Emerg Infect Dis* **2015**; 21:1638-1646.
19. Kubica GP, Baess I, Gordon RE, et al. A Co-operative Numerical Analysis of Rapidly Growing Mycobacteria. *J Gen Microbiol* **1972**; 73:55-70. Available at: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-73-1-55>.
20. Kusunoki S, Ezaki T. Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and Elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus (Kubica et al.) to Species Status: Mycobacterium abscessus comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **1992**; :240-245.
21. Adekambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, et al. Amoebal coculture of «Mycobacterium massiliense» sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol* **2004**; 42:5493-5501.
22. Adekambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of Mycobacterium bolletii sp. nov., Mycobacterium phocaicum sp. nov. and Mycobacterium aubagnense sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **2006**; 56:133-143.
23. Leao SC, Tortoli E, Paul Euzé J, 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 Mycobacteri. *Int J Syst Evol Microbiol* **2011**; 61:2311-2313.
24. Tortoli E, Kohl T a., Brown-Elliott B a., et al. Emended description of mycobacterium abscessus mycobacterium abscessus subsp. Abscessus and mycobacterium abscessus subsp. bolletii and designation of mycobacterium abscessus

- subsp. massiliense comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **2016**; 66:4471-4479.
25. Cho YJ, Yi H, Chun J, et al. 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**; 8:1-10.
  26. Davidson RM, Hasan N a., Reynolds PR, et al. Genome sequencing of *Mycobacterium Abscessus* isolates from patients in the United States and comparisons to Globally Diverse clinical strains. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:3573-3582.
  27. Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics* **2014**; 15.
  28. 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**; 53:3042-3046.
  29. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol* **2018**; 9:67. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00067/full>.
  30. Roux AL, Catherinot E, Soismier N, et al. Comparing *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium abscessus* lung infections in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* **2015**; 14:63-69. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2014.07.004>.
  31. Yoshida S, Arikawa K, Tsuyuguchi K, et al. Investigation of the population structure of *Mycobacterium abscessus* complex strains using 17-locus variable number tandem repeat typing and the further distinction of *Mycobacterium massiliense* hsp65 genotypes. **2014**; :254-261.

32. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-rincon D, et al. Emergence and spread of a human- transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. **2016**; 354.
33. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Br Med Bull* **2010**; 96:45-59.
34. Werf MJ Van Der, Ködmön C, Katalini V, et al. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. **2014**;
35. Brown-elliott B a, Jr RJW, Wallace RJ. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. **2002**; 15:716-746.
36. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **2009**; 4.
37. Baker AW, Lewis SS, Alexander BD, et al. Two-Phase Hospital-Associated Outbreak of *Mycobacterium abscessus* : Investigation and Mitigation. **2017**; 64.
38. Falkinham III JO, Norton CD, Lechevallier MW. Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium* , *Mycobacterium intracellulare* , and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems. **2001**; 67:1225-1231.
39. Decker BK, Palmore TN. Hospital water and opportunities for infection prevention. **2017**; 16:1-13.
40. Malcolm KC, Caceres SM, Honda JR, et al. *Mycobacterium abscessus* displays fitness for fomite transmission. *Appl Environ Microbiol* **2017**; :AEM.00562-17. Available at: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00562-17>.
41. Schnabel D, Esposito DH, Gaines J, et al. Multistate US Outbreak of Rapidly Growing Mycobacterial Infections Associated with Medical Tourism to the Dominican Republic, 2013-2014(1). *Emerg Infect Dis* **2016**; 22:1340-1347. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434822>.



Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry ( MALDI-TOF MS )  
-Based Identification of Mycobacterium spp. by Use of a Novel  
Two-Step Disruption Preparatory Technique. J Clin Microbiol  
**2016**; 54:495-496.

51. Suzuki H, Yoshida S, Yoshida A, Okuzumi K, Fukusima A, Hishinuma A. A novel cluster of Mycobacterium abscessus complex revealed by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Diagn Microbiol Infect Dis **2015**; 83:365-370. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.011>.
52. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, et al. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Microbiol Infect **2018**; 24:599-603.
53. Lévy-Frebault V, Grimont F, Grimont PAD, David HL. Deoxyribonucleic Acid Relatedness Study of the *Mycobacterium fortuitum*-*Mycobacterium chelonae* Complex. Int J Syst Bacteriol **1986**; 36:458-460. Available at: <http://ijs.sgmjournals.org/content/36/3/458.abstract>.
54. Hernandez SM, Morlock GP, Butler WR a Y, Crawford JT, Cooksey RC. Identification of Mycobacterium Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses Using Fluorescence Capillary Electrophoresis. **1999**; 37:3688-3692.
55. Lee H, Park H-J, Cho SN, Bai G-H, Kim S-J. Species Identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Polymorphism of the rpoB Gene. J Clin Microbiol **2000**; 38:2966-2971.
56. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:5699-5708.
57. Cocaign A, Kubiak X, Xu X, et al. Structural and functional characterization of an arylamine N-acetyltransferase from the pathogen Mycobacterium abscessus: Differences from other mycobacterial isoforms and implications for selective inhibition. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr **2014**; 70:3066-3079.

58. Sapriel G, Konjek J, Orgeur M, et al. Genome-wide mosaicism within *Mycobacterium abscessus*: evolutionary and epidemiological implications. *BMC Genomics* **2016**; 17:118. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2448-1>.
59. Harris K a., Kenna DTD, Blauwendraat C, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium abscessus* strains in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:1758-1761.
60. Brown-Elliott B a, Philley J V. Rapidly Growing *Mycobacteria*. *Microbiol Spectr* **2017**; :1-19.
61. Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd .( first genome of free-living organism ever completely sequenced )( includes fold-out genome map )( Cover Story ) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* **1995**; 496:1-16.
62. Howard ST. Recent progress towards understanding genetic variation in the *Mycobacterium abscessus* complex. *Tuberculosis* **2013**; 93:S15-S20. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-9792\(13\)70005-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-9792(13)70005-2).
63. Tan JL, Ng KP, Ong CS, Ngeow YF. Genomic Comparisons Reveal Microevolutionary Differences in *Mycobacterium abscessus* Subspecies. *Front Microbiol* **2017**; 8:1-10. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02042/full>.
64. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* **2013**; 14.
65. Shin SJ, Choi GE, Cho SN, et al. Mycobacterial genotypes are associated with clinical manifestation and progression of lung disease caused by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. *Clin Infect Dis* **2013**; 57:32-39.

66. Costa-Silva M, César A, Nuno PG, Azavedo F. Mycobacterium abscessus infection in a spa worker. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Adriat* **2018**; 27:159-160. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30244269>.
67. Lee M-R, Cheng A, Lee Y-C, et al. CNS infections caused by Mycobacterium abscessus complex: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:222-225.
68. El Helou G, Viola GM, Hachem R, Han XY, Raad II. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* **2013**; 13:166-174. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70316-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70316-X).
69. Liu R, To KKW, Teng JLL, et al. Mycobacterium abscessus bacteremia after receipt of intravenous infusate of cytokine-induced killer cell therapy for body beautification and health boosting. *Clin Infect Dis* **2013**; 57:981-991.
70. Lee MR, Ko JC, Liang SK, Lee SW, Yen DHT, Hsueh PR. Bacteraemia caused by Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and M. abscessus subsp. bolletii: Clinical features and susceptibilities of the isolates. *Int J Antimicrob Agents* **2014**; 43:438-441. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.007>.
71. Bernut A, Herrmann J-L, Kissa K, et al. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**; 111:E943-52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567393>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3956181>.
72. Howard ST, Rhoades E, Recht J, et al. Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **2006**; 152:1581-1590.

73. Llorens-Fons M, Pérez-Trujillo M, Julián E, et al. Trehalose polyphosphates, external cell wall lipids in *Mycobacterium abscessus*, are associated with the formation of clumps with cording morphology, which have been associated with virulence. *Front Microbiol* **2017**; 8:1-15.
74. Brambilla C, Llorens-Fons M, Julián E, et al. *Mycobacteria* clumping increase their capacity to damage macrophages. *Front Microbiol* **2016**; 7:1-12.
75. Ryan K, Byrd TF. *Mycobacterium abscessus*: Shapeshifter of the Mycobacterial World. *Front Microbiol* **2018**; 9:1-10. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02642/full>.
76. Roux A, Viljoen A, Simeone R, et al. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. **2016**;
77. Choo SW, Wee WY, Ngeow YF, et al. Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* reveals high evolutionary potential. *Sci Rep* **2014**; 4:4061. Available at: <http://www.nature.com/srep/2014/140211/srep04061/full/srep04061.html#affil-auth>.
78. Luthra S, Rominski A, Sander P. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in *Mycobacterium abscessus* Drug Resistance. *Front Microbiol* **2018**; 9:1-13. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02179/full>.
79. Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: A new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:810-818.
80. Broda A, Jebbari H, Beaton K, Mitchell S, Drobniewski F. Comparative drug resistance of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates from patients with and without cystic fibrosis in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* **2013**; 51:217-223.

81. Haworth CS, Banks J, Capstick T, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax* **2017**; 72:ii1-ii64.
82. Wayne P. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2. *Clin Lab Stand Inst* **2011**; 31.
83. Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, et al. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs* **2001**; 61:443-98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11324679>.
84. Mougari F, Bouziane F, Crockett F, et al. Selection of Resistance to Clarithromycin in *Mycobacterium abscessus* Subspecies. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61:e00943-16. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00943-16>.
85. Nash KA, Brown-Elliott AB, Wallace RJ. A Novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *mycobacterium abscessus* but is absent from *mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:1367-1376.
86. Kim H-Y, Kim BJ, Kook Y, et al. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiol Immunol* **2010**; 54:347-353.
87. Brown-Elliott B a., Vasireddy S, Vasireddy R, et al. Utility of sequencing the *erm(41)* gene in isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* with low and intermediate clarithromycin MICs. *J Clin Microbiol* **2015**; 53:1211-1215.
88. Stout JE, Floto RA. Treatment of *Mycobacterium abscessus*: All macrolides are equal, but perhaps some are more equal than others. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**; 186:822-823.
89. Meier A, Kirschner P, Springer B, et al. Identification Clarithromycin-Resistant. **1994**; 38:381-384.

90. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**; 70:140-150.
91. Pfister P, Hobbie S, Vicens Q, Böttger EC, Westhof E. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: Relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *ChemBioChem* **2003**; 4:1078-1088.
92. Prammananan T, Sander P, Brown B a, et al. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis* **1998**; 177:1573-1581.
93. Nessar R, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. Genetic analysis of new 16s rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66:1719-1724.
94. Dal Molin M, Gut M, Rominski A, Haldimann K, Becker K, Sander P. Molecular Mechanisms of Intrinsic Streptomycin Resistance in *Mycobacterium abscessus*. 2017. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01427-17>.
95. Cohen K a, Bishai WR, Pym AS. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr* **2014**; :1-16.
96. Brown-elliott BA, Nash KA, Wallace RJ. Antimicrobial Susceptibility Testing , Drug Resistance Mechanisms , and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. **2012**; 25:545-582.
97. da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66:1417-1430.
98. Demirci H, Wang L, Murphy IV F V., et al. The central role of protein S12 in organizing the structure of the decoding site of the ribosome. *Rna* **2013**; 19:1791-1801.

99. Aínsa J a, Pérez E, Pelicic V, Berthet FX, Gicquel B, Martín C. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the aac(2')-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac(2')-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **1997**; 24:431-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9159528>.
100. Tsai SH, Shen GH, Lin CH, Liao JR, Lai HC, Hu ST. Mab\_3168c, a Putative Acetyltransferase, Enhances Adherence, Intracellular Survival and Antimicrobial Resistance of *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **2013**; 8:1-9.
101. Maurer FP, Bruderer VL, Ritter C, Castelberg C, Bloemberg G V., Böttger EC. Lack of antimicrobial bactericidal activity in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:3828-3836.
102. Maurer FP, Bruderer VL, Castelberg C, et al. Aminoglycoside-modifying enzymes determine the innate susceptibility to aminoglycoside antibiotics in rapidly growing mycobacteria. *J Antimicrob Chemother* **2015**; 70:1412-1419.
103. Rominski A, Selchow P, Becker K, Brülle JK, Dal Molin M, Sander P. Elucidation of *Mycobacterium abscessus* aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three putative resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **2017**; 72:2191-2200.
104. Hurst-Hess K, Rudra P, Ghosh P. *Mycobacterium abscessus* WhiB7 regulates a species -specific repertoire of genes to confer extreme antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; :AAC.01347-17. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01347-17>.
105. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem* **1962**; 5:1063-1065. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm01240a021>.
106. Redgrave LS, Sutton SB, Webber M a., Piddock LJ V. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* **2014**;

22:438-445. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.

107. Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: Structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **1985**; 28:581-586.
108. de Moura VCN, da Silva MG, Gomes KM, et al. Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* recovered from postsurgical infections. *J Med Microbiol* **2012**; 61:115-125.
109. Huh HJ, Kim S-Y, Jhun BW, Shin SJ, Koh W-J. Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. *Infect Genet Evol* **2018**; :#pagerange#. Available at:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134818307846>.
110. Lee SH, Yoo HK, Kim SH, et al. The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea. *Ann Lab Med* **2014**; 34:31-37.
111. Kim S-Y, Jhun BW, Moon SM, et al. Mutations in *gyrA* and *gyrB* in Moxifloxacin-Resistant *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* Complex Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**; 62:1-5.
112. Rudra P, Hurst-Hess K, Lappierre P, Ghosha P. High levels of intrinsic tetracycline resistance in *Mycobacterium abscessus* are conferred by a tetracycline-modifying monooxygenase. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**; 62:1-14.
113. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* **2014**; 12:35-48.  
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336183>.
114. Ferro BE, Srivastava S, Deshpande D, et al. Tigecycline Is Highly Efficacious In *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**; 60:AAC.03112-15.  
Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.03112-15>.

115. Salgado N. Tigecycline : A Review of Properties , Applications , and Analytical Methods. **2010**; 32:282-288.
116. Wallace RJ, Brown-elliott BA, Crist CJ, Mann L, Wilson RW. Comparison of the In Vitro Activity of the Glycylcycline Tigecycline (Formerly GAR-936) with Those of Tetracycline, Minocycline, and Doxycycline against Isolates of Nontuberculous Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46:3164-3167.
117. Avorn J. Approval of a Tuberculosis Drug Based on a Paradoxical Surrogate Measure. *Jama* **2014**; 309:1349-1350.
118. Obregón-Henao A, Arnett K a., Henao-Tamayo M, et al. Susceptibility of mycobacterium abscessus to antimycobacterial drugs in preclinical models. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:6904-6912.
119. Philley J V., Wallace RJ, Benwill JL, et al. Preliminary results of bedaquiline as salvage therapy for patients with nontuberculous mycobacterial lung disease. *Chest* **2015**; 148:499-506.
120. Vesenbeckh S, Schönfeld N, Roth A, et al. Bedaquiline as a potential agent in the treatment of Mycobacterium abscessus infections. *Eur Respir J* **2017**; 49:10-12. Available at: <http://erj.ersjournals.com/content/49/5/1700083>.
121. Lounis N, Gevers T, Van Den Berg J, Vranckx L, Andries K. ATP synthase inhibition of Mycobacterium avium is not bactericidal. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:4927-4929.
122. Kim TS, Choe JH, Kim YJ, et al. Activity of LCB01-0371, a Novel Oxazolidinone, against Mycobacterium abscessus. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**;
123. Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen A, et al. Mutations in the MAB\_2299c TetR regulator confer cross-resistance to clofazimine and bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**; Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01316-18>.

124. Long KS, Munck C, Andersen TMB, et al. Mutations in 23S rRNA at the peptidyl transferase center and their relationship to linezolid binding and cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:4705-4713.
125. Kim S, Woo B, Mi S, et al. Genetic mutations in linezolid-resistant *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium abscessus* clinical isolates. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* **2018**; :2016-2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.022>.
126. Beckert P, Hillemann D, Kohl T a., et al. rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:2743-2745.
127. Kumar P, Chauhan V, Silva RA, et al. *Mycobacterium abscessus* L,D-Transpeptidases Are Susceptible to Inactivation by Carbapenems and Cephalosporins but Not Penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61:1-13.
128. Dubée V, Soroka D, Cortes M, et al. Impact of  $\beta$ -lactamase inhibition on the activity of ceftaroline against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:2938-2941.
129. Lefebvre AL, Dubée V, Cortes M, Dorchene D, Arthur M, Mainardi JL. Bactericidal and intracellular activity of  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus*..pdf. 2016;
130. Soroka D, Dubée V, Soulier-Escrihuela O, et al. Characterization of broad-spectrum *mycobacterium abscessus* class A  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **2014**; 69:691-696.
131. Jagielski T, Minias A, van Ingen J, et al. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **2016**; 29:239-290.
132. Thomson R, Tolson C, Sidjabat H, Huygens F, Hargreaves M. *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection. **2013**;

133. Thomson RM, Carter R, Tolson C, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. Factors associated with the isolation of Nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water system in Brisbane, Australia. *BMC Microbiol* **2013**; 13.
134. Honda JR, Hasan NA, Davidson RM, et al. Environmental Nontuberculous Mycobacteria in the Hawaiian Islands. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**; 10:1-17.
135. Davidson RM. A Closer Look at the Genomic Variation of Geographically Diverse Mycobacterium abscessus Clones That Cause Human Infection and Disease. **2018**; 9:1-7.
136. Martiniano SL, Davidson RM, Nick JA. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis: Updates and the path forward. *Pediatr Pulmonol* **2017**; :1-8. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppul.23825>.
137. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: A retrospective cohort study. *Lancet* **2013**; 381:1551-1560. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60632-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60632-7).
138. Tortoli E, Kohl TA, Trovato A, et al. Mycobacterium abscessus in patients with cystic fibrosis: Low impact of inter-human transmission in Italy. *Eur Respir J* **2017**; 50:6-9.
139. Harris K a., Underwood A, Kenna DTD, et al. Whole-genome sequencing and epidemiological analysis do not provide evidence for cross-transmission of mycobacterium abscessus in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *Clin Infect Dis* **2015**; 60:1007-1016.
140. Duarte RS, Lourenço MCS, Fonseca LDS, et al. Epidemic of postsurgical infections caused by Mycobacterium massiliense. *J Clin Microbiol* **2009**; 47:2149-2155.
141. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **1995**; 33:2233-2239.

142. Machado GE, Matsumoto CK, Chimara E, et al. Multilocus sequence typing scheme versus pulsed-field gel electrophoresis for typing *Mycobacterium abscessus* isolates. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:2881-2891.
143. Wong YL, Ong CS, Ngeow YF. Molecular Typing of *Mycobacterium abscessus* Based on Tandem-. **2012**; 50:3084-3088.
144. Yoshida S, Arikawa K, Tsuyuguchi K, et al. Investigation of the population structure of *mycobacterium abscessus* complex strains using 17-locus variable number tandem repeat typing and the further distinction of *mycobacterium massiliense* hsp65 genotypes. *J Med Microbiol* **2014**; 64:254-261.
145. Kim SY, Kang YA, Bae IK, et al. Standardization of multilocus sequence typing scheme for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**; 77:143-149. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.023>.
146. Macheras E, Konjek J, Roux AL, et al. Multilocus sequence typing scheme for the *Mycobacterium abscessus* complex. *Res Microbiol* **2014**; 165:82-90.
147. Moore G, Cookson B, Gordon NC, et al. Whole-genome sequencing in hierarchy with pulsed-field gel electrophoresis: The utility of this approach to establish possible sources of MRSA cross-transmission. *J Hosp Infect* **2015**; 90:38-45. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2014.12.014>.
148. Cheng a., Sheng WH, Huang YC, et al. Prolonged postprocedural outbreak of *Mycobacterium massiliense* infections associated with ultrasound transmission gel. *Clin Microbiol Infect* **2016**; 22:382.e1-382.e11.
149. Furuya EY, Paez A, Srinivasan A, et al. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* wound infections among «lipotourists» from the United States who underwent abdominoplasty in the Dominican Republic. *Clin Infect Dis* **2008**; 46:1181-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444853>.

150. Galil K, Miller L a., Yakrus M a., et al. Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. *Emerg Infect Dis* **1999**; 5:681-687.
151. Koh W-J, Jeong B-H, Kim S-Y, et al. Mycobacterial Characteristics and Treatment Outcomes in *Mycobacterium abscessus* Lung Disease. *Clin Infect Dis* **2017**; 64:309-316. Available at: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/ciw724>.
152. Viana-Niero C, Lima KVB, Lopes ML, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J Clin Microbiol* **2008**; 46:850-855.
153. Cardoso AM, Martins de Sousa E, Viana-Niero C, et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes Infect* **2008**; 10:1552-1557.
154. Cheng a., Liu YC, Chen ML, et al. Extrapulmonary infections caused by a dominant strain of *Mycobacterium massiliense* (*Mycobacterium abscessus* subspecies *bolletii*). *Clin Microbiol Infect* **2013**; 19:E473-E482. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12261>.
155. Guimarães T, Chimara E, do Prado GVB, et al. Pseudooutbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak. *Am J Infect Control* **2016**; 44:e221-e226. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.06.019>.
156. Monego F, Duarte RS, Nakatani SM, et al. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. *Brazilian J Infect Dis* **2011**; 15:436-441. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70224-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70224-0).
157. Garcia-Navarro X, Barnadas MA, Dalmau J, Coll P, Gurguí M, Alomar A. *Mycobacterium abscessus* infection secondary to mesotherapy. *Clin Exp Dermatol* **2008**; 33:658-659.

158. Choi GE, Chang CL, Whang J, et al. 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**; 49:1107-1109.
159. Davidson RM, Hasan NA, de Moura VCN, Duarte RS, Jackson M, Strong M. Phylogenomics of Brazilian epidemic isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* reveals relationships of global outbreak strains. **2014**; 339602:1-16.
160. Aitken ML, Limaya A, Pottinger P, et al. Respiratory Outbreak of *Mycobacterium abscessus* Subspecies *massiliense* in a Lung Transplant and Cystic Fibrosis Center There has been no published report of direct or indirect patient- University of Washington University of Texas Health Science Center. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**; 185:231-232.
161. Bactec F. MGIT For BACTEC™ MGIT 960™ TB System. System **2006**;
162. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:e115.
163. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, et al. Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol* **2009**; 47:1985-1995.
164. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Botrger EC, Bodmer T. Rapid Identification of *Mycobacteria* to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **1993**; 31:175-178.
165. Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG. Analysis of *secA1* Gene Sequences for Identification of *Nocardia* Species. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2760-2766.
166. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**; 25:2078-2079.

167. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. **2012**; :1-9. Available at: <http://arxiv.org/abs/1207.3907>.
168. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. **2015**; 43.
169. Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **2014**; 30:1312-1313.
170. Ekblom R, Wolf JBW. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evol Appl* **2014**; 7:1026-1042.
171. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **1995**; 33:1760-1764.
172. Bastian S, Veziris N, Roux A-L, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rrl* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:775-781.
173. Maurer FP, Ruegger V, Ritter C, Bloemberg G V, Bottger EC. Acquisition of clarithromycin resistance mutations in the 23S rRNA gene of *Mycobacterium abscessus* in the presence of inducible *erm*(41). *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:2606-2611.
174. Lipworth S, Hough N, Leach L, et al. Whole-Genome Sequencing for Predicting Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**; 63:1-9.
175. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler : Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **2017**; :1-22.
176. Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nature* **1949**; 163:1949.

177. Wailan AM, Coll F, Heinz E, Tonkin-Hill G, Corander J, Thomson NR. rPinecone: Define sub-lineages of a clonal expansion 1 via a phylogenetic tree. **2018**; Available at: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7022558>.
178. Tonkin-Hill G, Lees JA, Bentley SD, Frost SDW, Corander J. RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. Wellcome Open Res **2018**; 3:93. Available at: <https://wellcomeopenresearch.org/articles/3-93/v1>.
179. Seemann T. Prokka : rapid prokaryotic genome annotation. **2014**; 30:2068-2069.
180. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, et al. Sequence analysis Roary : rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **2015**; 31:3691-3693.
181. Tortoli E, Fedrizzi T, Meehan CJ, et al. The new phylogeny of mycobacterium. Infect Genet Evol **2017**; Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.013>.
182. Kim B-J, Kim G-N, Kim B-R, Shim T-S, Kook Y-H, Kim B-J. Phylogenetic analysis of Mycobacterium massiliense strains having recombinant rpoB gene laterally transferred from Mycobacterium abscessus. PLoS One **2017**; 12:e0179237. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0179237>.
183. Harada T, Akiyama Y, Kurashima A, et al. Clinical and microbiological differences between Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense lung diseases. J Clin Microbiol **2012**; 50:3556-3561.
184. Kim HY, Kook Y, Yun YJ, et al. Proportions of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii strains among Korean Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus group isolates. J Clin Microbiol **2008**; 46:3384-3390.
185. O'Driscoll C, Konjek J, Heym B, et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus complex isolates in Ireland. J Cyst Fibros **2016**; 15:179-185. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2015.05.007>.

186. van Ingen J, de Zwaan R, Dekhuijzen RPN, Boeree MJ, van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae*-abscessus group isolation in 95 patients. *J Infect* **2009**; 59:324-331. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2009.08.016>.
187. Rubio M, March F, Garrigó M, Moreno C, Español M, Coll P. Inducible and acquired clarithromycin resistance in the mycobacterium abscessus complex. *PLoS One* **2015**; 10:1-10.
188. Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends Microbiol* **2017**; 25:447-455.
189. Alcaide F, Palop-Borrás B, Domingo D, Tudó G. Aplicación de la espectrometría de masas en micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2016**; 34:31-35.
190. Alsteens D, Verbelen C, Dague E, Raze D, Baulard AR, Dufrêne YF. Organization of the mycobacterial cell wall: A nanoscale view. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **2008**; 456:117-125.
191. Simon M, Alcaide F, Arevalo GB, et al. Session : P004 Molecular diagnostics - respiratory , STI and novel approaches Category : 4b . Diagnostic bacteriology - non-culture based , including molecular and Multicentre study on the improved identification of non-tuberculous mycobacteria with MALDI-TOF MS using three different preprocessing protocols General Universitario Gregorio Marañón ; Hospital General Universitario Gregorio Marañón ; Clinical Microbiology and Infectious Diseases de la Santa Creu I Sant Pau de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón ; Hospital General Universitario Gregorio Marañón ; Clinical Microbiology Lothian Hospital General Universitario Gregorio Marañón ; Microbiology. **2017**; :12-14.
192. Body BA, Beard MA, Slechta ES, et al. Evaluation of the Vitek MS v3.0 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Mycobacterium* and *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol* **2018**; 56:1-12.
193. Col L, Sriram R, Sahni BAK, Dudhat VL, Pujahari ACAK. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

- spectrometry ( MALDI-TOF MS ) for rapid identification of *Mycobacterium abscessus*. *Med J Armed Forces India* **2017**; 74:22-27. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2017.02.006>.
194. Fangous M-S, Mougari F, Gouriou S, et al. Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:3362-9. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25009048>.
  195. Panagea T, Pincus DH, Grogono D, et al. *Mycobacterium abscessus* Complex Identification with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* **2015**; 53:2355-2358. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25948607>.
  196. Teng SH, Chen CM, Lee MR, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can accurately differentiate between *Mycobacterium masillense* (*M. abscessus* subspecies *bolletti*) and *M. abscessus* (*Sensu Stricto*). *J Clin Microbiol* **2013**; 51:3113-3116.
  197. Jeong SH, Kim SY, Huh HJ, et al. Mycobacteriological characteristics and treatment outcomes in extrapulmonary *Mycobacterium abscessus* complex infections. *Int J Infect Dis* **2017**; 60:49-56. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.05.007>.
  198. Luo L, Li B, Chu H, et al. Characterization of *Mycobacterium Abscessus* Subtypes in Shanghai of China: Drug Sensitivity and Bacterial Epidemicity as well as Clinical Manifestations. *Medicine (Baltimore)* **2016**; 95:e2338. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26817866>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4998240>.
  199. Li B, Yang S, Chu H, et al. Relationship between Antibiotic Susceptibility and Genotype in *Mycobacterium abscessus* Clinical Isolates. **2017**; 8:1-7.

200. Shen Y, Wang X, Jin J, et al. In Vitro Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium fortuitum* Isolates to 30 Antibiotics. **2018**; 2018.
201. 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**; 25:170-174.
202. Sabin AP, Ferrieri P, Kline S. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Children: A Review. *Curr Infect Dis Rep* **2017**; 19:46. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11908-017-0597-2>.
203. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**; 175:367-416.
204. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. *Clin Lab Stand Inst* **2011**; 26:1-61.
205. Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, et al. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol* **2000**; 38:656-661.
206. Griffith DE. Nontuberculous mycobacterial disease: A comprehensive approach to diagnosis and management. Springer Nature Switzerland, 2019.
207. Shallom SJ, Gardina PJ, Myers TG, et al. New Rapid Scheme for Distinguishing the Subspecies of the *Mycobacterium abscessus* Group and Identifying *Mycobacterium massiliense* Isolates with Inducible Clarithromycin Resistance. **2013**; 51:2943-2949.
208. Luo RF, Curry C, Taylor N, Budvytiene I, Banaei N. Rapid detection of acquired and inducible clarithromycin resistance in

- Mycobacterium abscessus group by a simple real-time PCR assay. J Clin Microbiol **2015**; 53:2337-2339.
209. Vester B, Douthwaite S. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA MINIREVIEW Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother **2001**; 45:1-12.
  210. Vianna S, Ramis IB, Bierhals D, et al. Tetrahydropyridine derivative as efflux inhibitor in Mycobacterium abscessus. Integr Med Res **2018**; Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.020>.
  211. Pryjma M, Burian J, Kuchinski K, Thompson CJ. Antagonism between front line antibiotics clarithromycin and amikacin used for the treatment of *Mycobacterium abscessus* infections is mediated by the *whiB7* gene. Antimicrob Agents Chemother **2017**; :AAC.01353-17. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01353-17>.
  212. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry **2014**; 53:1565-1574.
  213. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system. J Antimicrob Chemother **2012**; 67:819-831.
  214. Matrat S, Aubry A, Mayer C, Jarlier V, Cambau E. Mutagenesis in the  $\alpha 3\alpha 4$  GyrA helix and in the toprim domain of GyrB refines the contribution of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. Antimicrob Agents Chemother **2008**; 52:2909-2914.
  215. Monego F, Duarte RS, Biondo AW. *gyrA* and *gyrB* gene mutation in ciprofloxacin-resistant Mycobacterium massiliense clinical isolates from Southern Brazil. Microb Drug Resist **2012**; 18:1-6.
  216. Guillemin I, Jarlier V, Cambau E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in Mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother **1998**; 42:2084-2088.

217. Devasia R, Blackman A, Eden S, et al. High Proportion of Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Novel Gyrase Polymorphisms and a *gyrA* Region Associated with Fluoroquinolone Susceptibility. *J Clin Microbiol* **2012**; :1390-1396.
218. Lee M-R, Sheng W-H, Hung C-C, Yu C-J, Lee L-N, Hsueh P-R. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. *Emerg Infect Dis* **2015**; 21. Available at: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/9/14-1634\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/9/14-1634_article.htm).
219. Eilertson B, Maruri F, Blackman A, Herrera M, Sterling TR. Reversion of phenotypic fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Endobronchial valves to treat a recurrent giant emphysematous bulla after bullectomy. *Int J Tuberc Lung Dis* **2016**; :1276-1277.
220. Eilertson B, Maruri F, Blackman A, et al. A novel resistance mutation in *eccC 5* of the ESX-5 secretion system confers ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* **2016**; :2419-2427.
221. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:603-612.
222. Ye M, Xu L, Zou Y, et al. Molecular Analysis of Linezolid-Resistant Clinical Isolates of. **2019**; :1-5.
223. David S, Mentasti M, Tewolde R, et al. Evaluation of an optimal epidemiologic typing scheme for *Legionella pneumophila* with whole genome sequence data using validation guidelines. *J Clin Microbiol* **2016**; 54:JCM.00432-16. Available at: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00432-16>.
224. Nikolayevskyy V, Kranzer K, Niemann S, Drobniewski F. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. *Tuberculosis* **2016**; 98:77-85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.009>.

225. Casali N, Broda A, Harris SR, Parkhill J, Brown T, Drobniewski F. Whole Genome Sequence Analysis of a Large Isoniazid-Resistant Tuberculosis Outbreak in London: A Retrospective Observational Study. *PLOS Med* **2016**; 13:e1002137. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002137>.
226. Walker TM, Lalor MK, Broda A, et al. Assessment of Mycobacterium tuberculosis transmission in Oxfordshire , UK , 2007 - 12 , with whole pathogen genome sequences : an observational study. *Lancet Respir Med* **2014**; 2:285-292.
227. Witney AA, Bateson ALE, Jindani A, et al. Use of whole-genome sequencing to distinguish relapse from reinfection in a completed tuberculosis clinical trial. **2017**; :1-13.
228. Shaw LP, Doyle RM, Kavaliunaite E, et al. Children with cystic fibrosis are infected with multiple subpopulations of Mycobacterium abscessus with different antimicrobial Running title : M . abscessus subclones in CF patients. **2018**;
229. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering R V. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect* **2018**; 24:350-354. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016>.





## **8.ANEXOS**



# **Anexo I: Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the *Mycobacterium abscessus* complex**

RESEARCH ARTICLE

# Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the *Mycobacterium abscessus* Complex

Marc Rubio<sup>1</sup>, Francesca March<sup>2</sup>, Montserrat Garrigó<sup>2</sup>, Carmen Moreno<sup>2</sup>, Montserrat Español<sup>2</sup>, Pere Coll<sup>1,2\*</sup>

**1** Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C 08193, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain, **2** Servei de Microbiologia, Fundació de Gestió de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/Sant Quintí 89, 08026, Barcelona, Spain

\* [PColl@santpau.cat](mailto:PColl@santpau.cat)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Rubio M, March F, Garrigó M, Moreno C, Español M, Coll P (2015) Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the *Mycobacterium abscessus* Complex. PLoS ONE 10(10): e0140166. doi:10.1371/journal.pone.0140166

**Editor:** Andres R. Floto, Cambridge University, UNITED KINGDOM

**Received:** February 11, 2015

**Accepted:** August 17, 2015

**Published:** October 8, 2015

**Copyright:** © 2015 Rubio et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III and co-financed by the European Development Regional Fund, "A way to achieve Europe" ERDF, and the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI) RD12/0015/0017. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

### Purpose

Clarithromycin was considered the cornerstone for the treatment of *Mycobacterium abscessus* complex infections. Genetic resistance mechanisms have been described and many experts propose amikacin as an alternative. Nevertheless, clarithromycin has several advantages; therefore, it is necessary to identify the non-functional *erm(41)* allele to determine the most suitable treatment. The aims of this study were to characterize the molecular mechanisms of clarithromycin resistance in a collection of *Mycobacterium abscessus* complex isolates and to verify the relationship between these mechanisms and the antibiogram.

### Materials and Methods

Clinical isolates of *M. abscessus* complex (n = 22) from 16 patients were identified using four housekeeping genes (*rpoB*, *secA1*, *sodA* and *hsp65*), and their genetic resistance was characterized by studying *erm(41)* and *rrl* genes. Nine strains were recovered from the clinical isolates and subjected to E-test and microdilution clarithromycin susceptibility tests, with readings at 3, 7 and 14 days.

### Results

We classified 11/16 (68.8%) *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 4/16 (25.0%) *M. abscessus* subsp. *bolletii*, and 1/16 (6.3%) *M. abscessus* subsp. *massiliense*. T28 *erm(41)* allele was observed in 8 *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and 3 *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. One strain of *M. abscessus* subsp. *bolletii* had an *erm(41)* gene truncated and was susceptible to clarithromycin. No mutations were observed in *rrl* gene first isolates. In three patients, follow-up of initial *rrl* wild-type strains showed acquired resistance.

*massiliense*, the *erm(41)* gene is known to have 2 deletions, making it non-functional. Sequence analysis of the *erm(41)* gene has been used to classify *M. abscessus* complex subspecies [17].

We collected *M. abscessus* complex clinical isolates from 1995 to 2014 at a university hospital in Spain. The aims of this study were to characterize the molecular mechanisms of clarithromycin resistance in a collection of *Mycobacterium abscessus* complex initial isolates, identified at the subspecies level, and to verify the relationship between the genetic resistance mechanisms and the antibiogram results. We also studied 10 isolates in the follow-up of 4 patients by molecular typing and phenotypic and genotypic antibiograms.

## Materials and Methods

### Ethics statement

This study was retrospective without interaction with patients and all the patients' information was de-identified prior to analysis. Therefore the Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau ethics committees waived the need for informed consent and approved this research study (IISBP-CLA-2014-23).

### Samples

Twenty-two clinical isolates were obtained between 1995 and 2014 from 16 patients: 3 from skin and 19 from lung infections. Ten isolates from 4 patients were used for follow-up: 3 from patient 1, 3 from patient 2, 2 from patient 3, and 2 from patient 4. DNA from all isolates was recovered for genotypic identification and molecular clarithromycin resistance analysis. Nine first recovered isolates from 9 individual patients were subjected to clarithromycin susceptibility tests.

### Subspecies classification

Total DNA was extracted from mycobacterial clinical isolates by thermal shock [18] or InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Analysis of *rpoB*, *secA1*, *sodA* and *hsp65* genes was performed for identification at the subspecies level, as described previously [12,13]. PCR products were sent to Macrogen for sequencing (Meibergdeef, 1105AZ Amsterdam, The Netherlands). The sequences obtained were analyzed using the BLAST algorithm (NCBI).

### Assessing the genetic basis of resistance

The *erm(41)* and *rml* genes were analysed for clarithromycin resistance. The *erm(41)* gene was amplified using primers *ermF* (5' -GACCGGGCCTTCTCGTGAT-3') and *ermR* (5' -GACTTCCCCGCACCGATTCC-3') [7,8]. The *rml* gene was amplified using primers 19F (5' -GTAGCGAAATTCCTTGTCGG-3') and 21R (5' -TTCCCGCTTAGATGCTTTCAG-3') [7]. For the *erm(41)* gene, we analysed the complete gene sequence of 673 bp and T28 polymorphism. For the *rml* gene, we analysed a fragment of 836 bp that included nucleotides 2058–2059, whose mutations cause clarithromycin resistance.

For *erm(41)* and *rml* amplification, the PCR conditions were 5 min at 95°C, then 35 cycles at 95°C for 60 s, 62°C (for *erm(41)*) but 55°C for *rml*) for 60 s, and 72°C for 90 s, followed by 72°C for 10 min in the final extension.

### Reference sequences

The reference sequences used for subspecies classification were *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977T, *M. abscessus* subsp. *bolletii* reference strain CCUG 50184 (GenBank accession

numbers AY859692 for *rpoB* and FJ442839.1 for *secA1*), *M. abscessus* subsp. *bolletii* reference strain CIP 108541 (GenBank accession numbers EU266576.1 for *hsp65* and AY862403 for *sodA*), and *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* CCUG 48898 (GenBank accession numbers AY593981 for *rpoB*, AY596465.1 for *hsp65*, NZ\_AKVF01000005.1 for *secA1* and AY593975 for *sodA*).

The reference sequence used for the analysis of *erm(41)* and *rml* genes was the *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977T (GenBank accession number NC\_010397).

### Clarithromycin susceptibility testing

Clarithromycin MIC determination was performed in 9/16 initial isolates by the E-test method (bioMérieux, bioMérieux España S.A., Madrid, Spain) in Mueller-Hinton agar plates at 30°C [19]. The clarithromycin susceptibility test was also done in cation-adjusted Mueller-Hinton medium using the broth microdilution method [5] in Sensititre RAPMYCOI plates (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, United Kingdom) according to CLSI guidelines [9]. Strains were incubated for 14 days, and clarithromycin MIC was read at 3, 7 and 14 days. Clarithromycin MIC cut-off for microdilution ranges from  $\leq 2$  susceptible to  $\geq 8$  resistant, and  $\leq 1$  susceptible to  $\geq 4$  resistant for the E-test [19].

### Patient follow-up

Strain typing in the patient follow-up was performed by variable-number of tandem-repeat analysis (VNTR). The primers used were TR45, TR109, TR116, TR150, TR155 and TR172. The six pairs of primers and loci were the same as used by Wong *et al.* [20]. The PCR conditions for VNTR were as follows: a initial denaturalization step of 15 min at 95°C; 30 cycles of denaturalization at 95°C for 60 s, annealing at 59°C for 60 s and an extension at 72°C for 90 s, with a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR amplicons were analyzed using the EPOCH capillary electrophoresis system (BioTek, Germany). Results were analyzed using GeneMapper (Applied Biosystems).

### Sequences accession numbers

The obtained sequences for each gene were submitted to GenBank and given the following accession numbers: KT185536 to KT185557 for *rpoB*, KT185514 to KT185535 for *hsp65*, KT185603 to KT185624 for *sodA*, KT185581 to KT185602 for *secA1*, KT185492 to KT185513 for *erm41* and KT185558 to KT185580 for *rml*.

## Results

### Multiple gene-based subspecies classification

Analysis of the initial isolate from each patient identified 11/16 *M. abscessus* subsp. *abscessus* (68.8%), 4/16 *M. abscessus* subsp. *bolletii* (25.0%) and 1/16 *M. abscessus* subsp. *massiliense* (6.3%). For all isolates except one, we observed agreement between *rpoB*, *secA1*, *sodA* and *hsp65* genes sequences. One strain (isolate 08I004 from Table 1) was *M. abscessus* subsp. *abscessus* according to *rpoB*, *sodA* and *hsp65* analysis but *M. abscessus* subsp. *bolletii* according to *secA1* gene. Table 1 shows subspecies classification of the 16 first clinical isolates included in the study.

### Genetic basis of resistance to clarithromycin in *M. abscessus* complex

Table 1 also shows *rml* and *erm(41)* results and the type of resistance in initial isolates. No mutations were observed in the *rml* gene in any of these isolates. For the *erm(41)* T28 polymorphism,

**Table 1. Clarithromycin resistance molecular mechanisms, clarithromycin susceptibility testing and subspecies identification of *M. abscessus* complex strains.**

Patient	Strain	Date	Identification of the strain	VNTR profile <sup>a</sup>	Source	<i>Erm nt</i> <sup>b</sup> 28 (Functionality)	<i>rrf</i> <sup>c</sup>	MIC <sup>d,e,f,g,h</sup>					
								Microdilution			E-test		
								3D	7D	14D	3D	7D	14D
1	071011	05/06/2007	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile I	Lung	C (Not functional)	Wt	<0.06	0.25	<2	<0.016	0.19	1.5
1	101281	24/10/2010	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile I	Lung	C (Not functional)	A2058G	>16			>256		
1	131330	08/10/2013	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile I	Lung	C (Not functional)	A2058G	>16			>256		
2	091152	24/03/2009	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile II	Lung	T (functional)	Wt	<0.06	4	>16	0.38	>256	>256
2	111110	23/02/2011	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile II	Lung	T (functional)	Wt	<2			0.75		
2	111441	12/12/2011	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile II	Lung	T (functional)	A2057G/A2057 <sup>i</sup>	8			64		
3	091380	17/09/2009	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile III	Lung	T (functional)	Wt	0.12	8	>16	0.094	4	>256
3	111289	05/07/2011	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Profile III	Lung	T (functional)	A2059G	>16			>256		
4	041462	22/12/2004	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	Profile IV	Lung	T (functional)	Wt	-	-	-	-	-	-
4	051586	24/11/2005	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	Profile IV	Lung	T (functional)	Wt	-	-	-	-	-	-
5	001031	01/11/1995	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	ND	Lung	T (functional)	Wt	0.12	16	>16	0.38	16	>256
6	141016	17/01/2014	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	ND	Lung	T (functional)	Wt	0.12	8	>16	<0.016	0.38	>256
7	071004	03/04/2007	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	ND	Skin	Gen truncated (Not functional)	Wt	-	-	-	-	-	-
8	051284	15/07/2005	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	ND	Skin	Gen truncated (Not functional)	Wt	-	-	-	-	-	-
9	081420	31/10/2008	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Lung	T (functional)	Wt	0.12	16	>16	0.25	>256	>256
10	101050	18/02/2010	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Lung	T (functional)	Wt	-	-	-	-	-	-
11	061323	20/08/2006	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Lung	T (functional)	Wt	-	-	-	-	-	-
12	091456	04/12/2009	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Lung	T (functional)	Wt	-	-	-	-	-	-
13	081004	28/02/2008	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Skin	T (functional)	Wt	0.25	8	>16	0.125	8	>256
14	011019	03/10/1997	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Lung	T (functional)	Wt	0.12	>16	>16	0.125	192	>256
15	141019	23/01/2014	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Lung	C (Not functional)	Wt	0.06	0.12	<2	<0.016	<0.016	<1
16	141069	13/03/2014	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ND	Skin	C (Not functional)	Wt	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> ND, Not determined

<sup>b</sup> nt, Nucleotide

<sup>c</sup> Wt, Wild type

<sup>d</sup> D, days

<sup>e</sup> MIC values in µg/mL

<sup>f</sup> MIC ranges for microdilution broth: ≤ 2, Susceptible; ≥ 8, Resistant

<sup>g</sup> MIC ranges for E-test: ≤ 1, Susceptible; ≥ 4, Resistant

<sup>h</sup> The hyphen indicates that phenotypic techniques were not performed due to strain non-recovery.

<sup>i</sup> Double peak in DNA sequence

doi:10.1371/journal.pone.0140166.t001

we identified 8 *M. abscessus* subsp. *abscessus* and 3 *M. abscessus* subsp. *bolletii*. For the *erm(41)* C28 polymorphism, we identified 3 *M. abscessus* subsp. *abscessus*. We found an *erm(41)* truncated gene in 1 *M. abscessus* subsp. *massiliense* and in 1 *M. abscessus* subsp. *bolletii*, in each case with two deletions at positions 64 and 65 and a final deletion of 276 bp, as described in the literature for *M. abscessus* subsp. *massiliense* [16].

For the first time, to our knowledge, in this study was found an *erm(41)* gene truncated in 1 *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Data of the similarity of the *rpoB*, *secA1*, *sodA* and *hsp65* gene sequences of this strain and the reference strains of *M. abscessus* complex is shown in the Table 2.

### Clarithromycin susceptibility testing

We recovered 9 strains of the *M. abscessus* group for phenotypic analysis. E-test and microdilution methods were performed with recovered strains to compare the two methods and relate the *in vitro* MIC results with our genotypic analysis. Table 1 shows clarithromycin MIC for the E-test and microdilution. All strains were clarithromycin-susceptible with both techniques at 3 days. Five out of nine strains were resistant at 7 days for both methods and two strains were susceptible. One strain was resistant for E-test and susceptible for microdilution, the remaining strain was susceptible for E-test and resistant for microdilution (Table 1). At day 14, 7/9 strains were resistant with both methods. In both methods, susceptible and resistant strains agreed at day 14.

### Patient follow-up

Table 1 also describes the follow-up results for 4 patients: *M. abscessus* subsp. *abscessus* strains obtained from 3 patients (Patients 1–3) showed the acquisition of a point mutation in the *rrl* gene. Patient 1, *erm(41)* C28 sequevar, showed an acquired resistance at position A2058G. Patient 3, *erm(41)* T28 sequevar, showed an acquired resistance at position A2059G. The *erm(41)* T28 sequevar from patient 2 showed a double peak at position A2057G/A in the DNA sequence, indicating a new selected mutation for clarithromycin constitutive resistance. In contrast, the *M. abscessus* subsp. *bolletii* strain from patient 4 showed no acquired mutation in the *rrl* gene.

All the strains studied in the follow-up were identical to the initial isolates for each patient. Each patient had a different strain. Table 1 also shows the profile of the variable-number of tandem-repeat assay.

**Table 2. Comparison between *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* 071004 strain and *Mycobacterium abscessus* complex reference strains.**

Strain	Reference Strains	Percentage of identity			
		<i>rpoB</i>	<i>hsp65</i>	<i>secA1</i>	<i>sodA</i>
71004 <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977T	95.75	98.6	98.02	98.64
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CCGU 50184 <sup>b</sup> and CIP 108541 <sup>c</sup>	<b>99.45</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99.79</b>
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> CCUG48898	98.27	99.3	98.71	98.46

<sup>a</sup> Values shown in bold indicate the highest percentage of identity

<sup>b</sup> *M. abscessus* subsp. *bolletii* CCGU 50184 used for *rpoB* and *secA1* genes.

<sup>c</sup> *M. abscessus* subsp. *bolletii* CIP 108541 used for *hsp65* and *sodA* genes.

doi:10.1371/journal.pone.0140166.t002

## Discussion

Clarithromycin is a key agent in the treatment of *M. abscessus* complex infections [9]. The main cause of treatment failure is inducible resistance [8,21]. Significant differences in the *erm(41)* gene associated with inducible resistance are found among the *M. abscessus* complex [15,22], suggesting that an accurate *erm(41)* allele identification is important to predict treatment outcomes. As the three *M. abscessus* complex subspecies are closely related and show horizontal gene transfer [11,23], more than one housekeeping gene is needed for subspecies identification [13]. Nevertheless, the genes to be used are not defined [24]. This work aimed to characterize the molecular mechanisms of clarithromycin resistance in the *M. abscessus* complex and to verify the relationship between these mechanisms and the clarithromycin susceptibility test.

In contrast with some authors [12,13] and in agreement with Nie *et al.* [25], we found each gene (*rpoB*, *secA1*, *sodA* and *hsp65*) was able to classify *M. abscessus* subspecies, with the exception of one strain, which was identified as *M. abscessus* subsp. *abscessus* by *rpoB*, *sodA* and *hsp65*, and *M. abscessus* subsp. *bolletii* by *secA1* gene. In contrast with our results, Tan *et al.* [26] were able to correctly classify all their strains by sequencing the *secA1* gene. *M. abscessus* subsp. *abscessus* was the most predominant subspecies of the complex (68.8%), in keeping with findings in the literature [12,21,27], where it ranges from 51.2% to 78.5%. Next in predominance was *M. abscessus* subsp. *bolletii* (25.0%), in contrast with many papers where the second most frequent subspecies is *M. abscessus* subsp. *massiliense* [16,28].

Regarding genetic resistance mechanisms, *rrl* gene sequencing in the initial isolates showed an absence of mutations. This is in contrast with previous reports [21,29], where the presence of constitutive clarithromycin resistance ranges from 2.7% to 28.6%. In agreement with the literature, however, we observed inducible resistance due to nucleotide T28 of *erm(41)* in 68.8% (11/16) of *M. abscessus* complex isolates [8,21].

As previously reported, *erm(41)* is a subspecies-specific gene in the *M. abscessus* group [7,16]. We found only one discrepancy with respect to the published criteria [7,17], attributed to an *M. abscessus* subsp. *bolletii* strain with a truncated *erm(41)* gene. To our knowledge, this is the first description of *M. abscessus* subsp. *bolletii* with a non-functional truncated *erm(41)* gene. The strain (07I004) matched *M. abscessus* subsp. *bolletii* reference strains CCUG 50184 and CIP108541 for the four housekeeping genes studied but not for the *erm(41)* gene. This finding supports other reports suggesting that gene transfer and recombination occurs between subspecies [11,28]. Several cases of *M. abscessus* subsp. *massiliense* with the functional *erm(41)* gene have been reported [30]. Our data thus support the notion that *erm(41)* is not a subspecies-specific gene, and that *erm(41)* gene sequencing should not be used as the only technique to classify *M. abscessus* complex subspecies.

The data produced by our study revealed the acquisition of constitutive clarithromycin resistance. Constitutive resistance to clarithromycin due to mutations in *rrl* was selected in both *erm(41)* C28 (as shown in Patient 1) [7] and *erm(41)* T28 strains (as shown in Patients 2 and 3) [21]. With the advantage of having the initial *rrl* wild-type strains, our results support the idea, in opposition to Bastian *et al.* [7], that selection of *rrl* mutants is similar in T28 and C28 strains.

We described the acquisition of a 2057 point mutation in a T28 *M. abscessus* subsp. *abscessus* strain with an initial *rrl* wild-type isolate. A double peak in the 2057 DNA sequence was observed, which suggests the coexistence of two mixed DNA populations (an *rrl* wild-type and a 2057 mutated population), since these mycobacteria possess only a single copy of the *rrl* gene in their genome [5]. The amplification and DNA sequencing was repeated three independent times to discard amplification or sequencing errors. Further work should include cloning to determine whether two variants exist in this strain.

It is important to emphasize that mutations at position 2057 of *rrl* in other microorganisms are related to medium-low levels of clarithromycin resistance *in vitro* [31], as seen in this study. Vester *et al.* [31] also reported that mutations at positions 2057 and 2611 of the *rrl* gene caused resistance to macrolides and ketolides due to their proximity to the action centre. Mutations at these positions obstruct the link between the antibiotic and its target, and cause low-level resistance to 14-membered-ring macrolides and no resistance to 16-membered-ring macrolides. In contrast, recently, Luo *et al.* [32] reported a 2057 point mutation in a *M. abscessus* subsp. *abscessus* which showed a high level resistance (MIC >256 µg/mL).

In our study we found complete agreement between *erm(41)*, *rrl* sequencing and clarithromycin susceptibility testing. After a 3-day culture, all strains were susceptible as was observed with both methods (E-test and microdilution). Following a 7-day culture, 85% (6/7) of inducible resistance [*erm(41)* T28 sequevar] was detected, and after a 14-day culture, we detected all inducible resistance strains. Although we did not find significant differences between the two methods, one strain with the E-test and one strain with the microdilution method took 14 days to reveal resistance. This is in contrast with other authors who report differences between E-test and microdilution performance [33]. Although the microdilution is the standard method according to the CLSI [9], in our study, the E-test showed the same results as the microdilution, and MIC reading at early stages was easier.

We would like to emphasize that one of the limitations of our study is the relatively small amount of isolates included. This is important to consider when drawing conclusions on epidemiology, but it does not invalidate the molecular observations.

## Conclusion

In conclusion, our findings identified one strain of *M. abscessus* subsp. *bolletii* with a truncated and non-functional *erm(41)* gene. Caution is needed if *erm(41)* gene sequencing is the only technique used for subspecies identification. Although clarithromycin constitutive resistance is not detected in the initial isolates, it can be acquired in T28 and C28 *erm(41)* strains of the *M. abscessus* complex. Finally, the acquisition of a mutation at position 2057 in the *rrl* gene confers medium-low level resistance to clarithromycin.

## Acknowledgments

The authors thank Dr Julià Gonzalez (Hospital Clinic Barcelona) for his support with the microdilution method and Carolyn Newey for supervised the writing of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PC. Performed the experiments: MR FM MG CM ME. Analyzed the data: MR FM PC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR FM MG CM ME PC. Wrote the paper: MR PC.

## References

1. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147: 1271–8. doi: [10.1164/ajrccm/147.5.1271](https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.5.1271) PMID: [8484642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8484642/)
2. Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschen JA, Stone MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis.* 5: 657–79. PMID: [6353528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6353528/)
3. Nessar R, Cambau E, Reyat JM, 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) PMID: [22290346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22290346/)

4. Lee SH, Yoo HK, Kim SH, Koh W-J, 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) PMID: [24422193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24422193/)
5. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott B a, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175: 367–416. doi: [10.1164/rccm.200604-571ST](https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST) PMID: [17277290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17277290/)
6. Brown-Elliott B A, Nash K A, Wallace R J. Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25: 545–582. doi: [10.1128/CMR.05030-11](https://doi.org/10.1128/CMR.05030-11) PMID: [22763637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22763637/)
7. Bastian S, Veziris N, Roux A-L, Brossier F, Gaillard J-L, Jarlier V, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm(41)* and *rft* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 775–81. doi: [10.1128/AAC.00861-10](https://doi.org/10.1128/AAC.00861-10) PMID: [21135185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135185/)
8. Nash K a, Brown-Elliott B a, Wallace R J. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 1367–76. doi: [10.1128/AAC.01275-08](https://doi.org/10.1128/AAC.01275-08) PMID: [19171799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19171799/)
9. Clinical & Laboratory Standards Institute, 2011. M24-A2: Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard Second Edition—M24A2.
10. 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) PMID: [21037035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21037035/)
11. 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) PMID: [24886480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24886480/)
12. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, et al. Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1985–95. doi: [10.1128/JCM.01688-08](https://doi.org/10.1128/JCM.01688-08) PMID: [19420162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19420162/)
13. Macheras E, Roux A-L, Ripoll F, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Gaillard J-L, et al. Inaccuracy of single-target sequencing for discriminating species of the *Mycobacterium abscessus* group. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 2596–600. doi: [10.1128/JCM.00037-09](https://doi.org/10.1128/JCM.00037-09) PMID: [19515839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19515839/)
14. Fangous M-S, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, et al. A classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014; doi: [10.1128/JCM.00788-14](https://doi.org/10.1128/JCM.00788-14) PMID: [25009048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25009048/)
15. Brown-Elliott B A, Vasireddy S, Vasireddy R, Iakhiaeva E, Howard ST, Nash K, et al. Utility of sequencing the *erm(41)* gene in isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* with low and intermediate clarithromycin MICs. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 1211–5. doi: [10.1128/JCM.02950-14](https://doi.org/10.1128/JCM.02950-14) PMID: [25653399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25653399/)
16. Kim H-Y, Kim BJB-J, Kook Y-HY, Yun Y-J, Shin JH. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiol Immunol*. 2010; 54: 347–53. doi: [10.1111/j.1348-0421.2010.00221.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00221.x) PMID: [20536733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536733/)
17. Yoshida S, Tsuyuguchi K, Suzuki K, Tomita M, Okada M, Shimada R, et al. Rapid identification of strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group through *erm(41)* gene pyrosequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Elsevier Inc.; 2014; 1–6. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2014.04.001](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.04.001)
18. Zhang ZQ, Ishaque M. Evaluation of methods for isolation of DNA from slowly and rapidly growing mycobacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1997; 65:469–76. PMID: [9465157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9465157/)
19. Biehle JONR, Cavalleri SJ, Saubolle MA. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. These include: Evaluation of Etest for Susceptibility Testing of Rapidly Growing Mycobacteria. 1995; 33.
20. Wong YL, Ong CS, Ngeow YF. Molecular typing of *Mycobacterium abscessus* based on tandem-repeat polymorphism. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 3084–8. doi: [10.1128/JCM.00753-12](https://doi.org/10.1128/JCM.00753-12) PMID: [22760048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22760048/)
21. Lee S-H, Yoo HK, Kim SH, Koh W-J, Kim CK, Park YK, et al. Detection and Assessment of Clarithromycin Inducible Resistant Strains Among Korean *Mycobacterium abscessus* Clinical Strains: PCR Methods. *J Clin Lab Anal*. 2014; 6: 1–6. doi: [10.1002/jcla.21702](https://doi.org/10.1002/jcla.21702)
22. Koh W-J, Jeon K, Lee NY, Kim B-J, Kook Y-H, Lee S-H, et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183: 405–10. doi: [10.1164/rccm.201003-0395OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0395OC) PMID: [20833823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833823/)
23. Choo SW, Wee WY, Ngeow YF, Mitchell W, Tan JL, Wong GJ, et al. Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* reveals high evolutionary potential. *Sci Rep*. 2014; 4: 4061. doi: [10.1038/srep04061](https://doi.org/10.1038/srep04061) PMID: [24515248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24515248/)

24. Blauwendraat C, Dixon GLJ, Hartley JC, Foweraker J, Harris K A. The use of a two-gene sequencing approach to accurately distinguish between the species within the *Mycobacterium abscessus* complex and *Mycobacterium chelonae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 1847–53. doi: [10.1007/s10096-011-1510-9](https://doi.org/10.1007/s10096-011-1510-9) PMID: [22222989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22222989/)
25. Nie W, Duan H, Huang H, Lu Y, Bi D, Chu N. Species identification using *rpoB* and *hsp65* and susceptibility testing to eight antibiotics of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. *Int J Infect Dis*. 2014; doi: [10.1016/j.ijid.2014.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.014) PMID: [24932856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24932856/)
26. Tan JL, Khang TF, Ngeow YF, Choo SW. A phylogenomic approach to bacterial subspecies classification: proof of concept in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics*. 2013; 14: 879. doi: [10.1186/1471-2164-14-879](https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-879) PMID: [24330254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24330254/)
27. Kim H-Y, Kook Y, Yun Y-J, Park CG, Lee NY, Shim TS, et al. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae*-*Mycobacterium abscessus* group isolates. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 3384–90. doi: [10.1128/JCM.00319-08](https://doi.org/10.1128/JCM.00319-08) PMID: [18753344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18753344/)
28. Cho Y-J, Yi H, Chun J, Cho S-N, Daley CL, Koh W-J, et al. 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; 8: e81560. doi: [10.1371/journal.pone.0081560](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081560) PMID: [24312320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312320/)
29. Yoshida S, Tsuyuguchi K, Suzuki K, Tomita M, Okada M, Hayashi S, et al. Further isolation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and subsp. *bolletii* in different regions of Japan and susceptibility of these isolates to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents*. Elsevier B.V.; 2013; 42: 226–31. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2013.04.029](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.029)
30. Gray TJ, Kong F, Jelfs P, Sintchenko V, Chen SC. Improved Identification of Rapidly Growing Mycobacteria by a 16S-23S Internal Transcribed Spacer Region PCR and Capillary Gel Electrophoresis. *PLoS One*. 2014; 9: e102290. doi: [10.1371/journal.pone.0102290](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102290) PMID: [25013955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25013955/)
31. Vester B, Douthwaite S. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA MINIREVIEW Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:1–12.
32. Luo RF, Curry C, Taylor N, Budvytė I, Banaei N. Rapid Detection of Acquired and Inducible Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus* group by a Simple Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2015; 1–12. doi: [10.1128/JCM.00132-15](https://doi.org/10.1128/JCM.00132-15) PMID: [25903572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25903572/)
33. Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, Fahle GA, Boulet B, Plaunt M, et al. Multisite Reproducibility of Etest for Susceptibility Testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:656–61. PMID: [10655363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655363/)

**Anexo II: Whole genome sequencing does not support patient-to-patient as the frequent route of transmission for *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis patients.**

Artículo presentado en la revista *Clinical Infectious Disease* pendiente de aprobación con el número .  
También disponible en el repositorio *bioRxiv* disponible en .

1 **Whole genome sequencing does not support patient-to-patient as the frequent route of**  
2 **transmission for *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis patients.**

3

4 **Running title: *M. abscessus* transmission in CF patients**

5

6 Ronan M. Doyle<sup>1,2\*</sup>, Marc Rubio<sup>3\*</sup>, Garth Dixon<sup>1,2</sup>, John Hartley<sup>1,2</sup>, Nigel Klein<sup>4,2</sup>, Pere  
7 Coll<sup>3\*</sup>, Kathryn A. Harris<sup>1,2\*</sup>

8 1. Department of Microbiology, Virology and Infection Control, Great Ormond Street

9 Hospital NHS Foundation Trust, London, UK.

10 2. National Institute for Health Research Biomedical Research Centre at Great Ormond

11 Street Hospital for Children NHS Foundation Trust and UCL, UK.

12 3. Spain

13 4. UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, UK.

14

15\* Authors contributed equally

16 **Corresponding author:** Kathryn Harris (kathryn.harris@gosh.nhs.uk)

17

18 **Keywords:** Nontuberculous mycobacteria, whole-genome sequencing, transmission, cystic  
19 fibrosis, phylogenomics.

20

21 **Key points** (40 word limit, currently 34 words):

22 • Whole genome sequencing should replace current molecular assays used routinely in

23 clinical microbiology laboratories.

24 • Patient-to-patient spread of *M. abscessus* is not common.

25 • Proper environmental screening is needed to understand acquisition of *M. abscessus*

26 infections.

27 **Abstract (250 word limit, current 246 words)**

28 **Background:**

29 *Mycobacterium abscessus* is an extensively drug resistant pathogen that causes pulmonary  
30 disease particularly in cystic fibrosis patients. Identifying direct patient-to-patient  
31 transmission of *M. abscessus* is critically important in infection control and the management  
32 of these high-risk patients. While clinical laboratories use molecular epidemiology to  
33 understand transmission it is only recently that laboratories have begun adopting whole-  
34 genome sequencing (WGS) for these studies. However there is still conflicting evidence as to  
35 how *M. abscessus* is acquired and transmitted within these patient cohorts.

#### 36 **Methods:**

37 We sequenced the whole genomes of 145 *M. abscessus* isolates from 62 patients seen at four  
38 hospitals in two countries over 16 years.

#### 39 **Results:**

40 We have shown that WGS of *M. abscessus* isolates can provide enough information to  
41 replace multiple existing molecular assays used routinely in clinical microbiology  
42 laboratories. We found only one episode of direct patient-to-patient transmission. In contrast,  
43 we found many instances where patients acquired unique *M. abscessus* strains even after  
44 spending considerable time on the same wards with other *M. abscessus* positive patients. We  
45 have also shown that a comparison of a fixed number of core single nucleotide variants  
46 (SNVs) cannot be used to infer cross-transmission across all *M. abscessus* isolates and  
47 propose analysing samples within clonal complexes separately.

#### 48 **Conclusions:**

49 This novel analysis has demonstrated that the majority of patients in this study have not  
50 acquired *M. abscessus* through direct patient-patient transmission. Tracking transmission  
51 using WGS will only realise its full potential with proper environmental screening as well as  
52 patient sampling.

### 53Background (2793 words)

54*Mycobacterium abscessus* (recently renamed as *Mycobacteroides abscessus*) [1], is a group  
55of three closely related subspecies *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp.  
56*massiliense* and *M. abscessus* subsp. *bolletii* [1,2]. These rapidly-growing, non-tuberculous  
57Mycobacteria cause chronic pulmonary disease, particularly in patients with cystic fibrosis  
58(CF) and other chronic lung diseases. *M. abscessus* is an important pathogen that has  
59emerged in the CF patient population that has been associated with poor clinical outcomes,  
60especially following lung transplantation [3–5]. This is due, at least in part, to the extensive  
61antibiotic resistance that makes infections with this organism difficult to treat [2,6]. CF  
62patients infected with *M. abscessus* are frequently not listed for transplant, therefore the  
63acquisition of this pathogen is considered to be a serious complication in this group.

64

65The epidemiology of *M. abscessus* strains has been studied using Variable Nucleotide  
66Tandem Repeats (VNTR) and Multi Locus Sequence Typing (MLST) [7]. The clustering of  
67globally spread sequence types was confirmed with whole genome sequencing (WGS) and  
68has provided greater resolution in how the various lineages are related as well as predicting  
69possible transmission routes [8,9]. A dominant method of transmission of *M. abscessus*  
70remains contested [10,11], with evidence for and against patient-to-patient transmission being  
71the common route [8,12]. *M. abscessus* is ubiquitous in the environment with its niche  
72hypothesised to be free-living amoeba [13,14], but due to the difficulties in isolating the  
73organism, little has been done to track environment-to-patient acquisition. Confirmation of  
74direct patient-to-patient transmission is important as it influences management of high-risk  
75patients, increases the effectiveness of infection control interventions and directs the use of  
76limited resources.

77

78In this retrospective study we assessed utility of using WGS to characterise subspecies,  
79antimicrobial resistance (AMR) profiles and typing of *M. abscessus* isolates. We also wanted  
80to utilise the data to investigate the scale of patient-to-patient transmission and whether  
81identification of single nucleotide variants (SNVs) by WGS can confirm transmission. To do  
82this we have sequenced the genomes 145 *M. abscessus* clinical isolates from a well  
83characterised cohort of 62 patients from four hospitals in two countries over 16 years.

## 84Methods

### 85Patients and Samples collection

86We collected 33 *M. abscessus* isolates from 30 patients at Hospital de la Santa Creu I Sant  
87Pau (bcn\_hsp), Hospital Clínic (bcn\_hcl) and Hospital Vall d'Hebron (bcn\_hvh), Barcelona,  
88Spain and 112 isolates from 32 patients from Great Ormond Street Hospital (ldn\_gos),  
89London, UK (Supplementary table 1). Demographic and patient location data were obtained  
90from the patient administration system and microbiological data from the laboratory  
91information management system using SQL and Excel spreadsheets. Additional sources of  
92information included CF and transplant databases. American Thoracic Society consensus  
93guidelines were used to verify evidence of nontuberculous mycobacterial infection [15].

94

### 95DNA extraction and Whole-Genome Sequencing

96One hundred and forty-five *M. abscessus* isolates from 62 patients were analysed using  
97whole-genome sequencing. Briefly, DNA was extracted from all isolates as previously  
98described [16] with some modifications: DNA was extracted from all isolates using Qiagen  
99EZ1 Blood extraction kit with a previous step of bead-beating (Qiagen, Crawley, United  
100Kingdom). Then total DNA concentration was determined using a Qubit fluorometer  
101(ThermoFisher). Fifty nanograms of DNA was prepared using Nextera Library Preparation kit  
102(Illumina) and post-PCR clean-up was carried out using Ampure XP beads (Beckman).  
103Library size was validated using the Agilent 2200 TapeStation with Agilent D5000  
104ScreenTape System (Willoughby, Australia) and 150bp paired-end reads were sequenced on a  
105NextSeq 550 system (Illumina).

106

### 107Multi Locus Sequence Typing (MLST) analysis

108We used a custom bash script to extract the alleles of the multi-locus sequence typing  
109(MLST) profile from the mapped reads to the reference genome. The MLST profile was

110obtained using the Institut Pasteur MLST database  
111(<http://bigsd.b.pasteur.fr/mycoabscessus/mycoabscessus.html>).

112

### 113Read mapping and variant calling

114Sequenced reads for all samples were first mapped to *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC  
11519977 using BMap v37.90 (Joint Genome Institute). Single nucleotide variants (SNVs)  
116were called against the reference genome using freebayes v1.2.0 [17] and variants were  
117filtered to only include those at sites with a mapping quality >30, a base quality >30, at least  
118five supporting reads, where the variant was present on at least two forward and reverse  
119strand reads and present at the 5' and 3' end of at least two reads.

120

### 121Phylogenetic analysis

122Potential regions of recombination were identified from the consensus genome sequences  
123using Gubbins v2.3.1 [18]. Regions within the genome with low coverage (< 5x) were  
124masked on a per sample basis and regions with low coverage across 75% of samples were  
125masked across the entire dataset. A maximum likelihood tree was inferred from all samples  
126using RAxML v8.2.4 [19] using a GTRCAT model with 99 bootstraps. Sub-species were  
127identified for each sample based on their position upon this tree.

128

129Separate sub-trees were also inferred for *M. abscessus* subsp. *massilense* sequences, as well  
130as for *M. abscessus* subsp. *abscessus* ST-1 and ST-26 sequences. All samples in each sub-tree  
131were mapped against a suitable reference. *M. abscessus* subsp. *massilense* str. GO 06 was  
132used as the reference sequencing for study *massilense* sequences and the *de novo* assembly of  
133the earliest ST-26 study sequence (ldn\_gos\_2\_520) was used as a reference for other ST-26  
134samples. *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 was again used as the reference for ST-  
1351 sequences as it is the same sequence type. All sub-trees were generated using the same

136method outlined above, apart from ST-26 subtree, which did not use Gubbins but instead  
137variants were filtered if 3 SNVs were found within a 100bp window.

138

#### 139**Sequence clusters**

140Sequence clusters to infer possible transmission were generated using three different methods  
141on each subtree. First we used a SNV threshold that was based on the upper bounds of all  
142within patient diversity applied to complete linkage hierarchical clustering based on pairwise  
143SNV matrix. Secondly we assigned clusters using the R package rPinecone as it incorporates  
144SNV thresholds and root-to-tip distances and so has been useful when applied to clonal  
145populations [20]. Lastly we also used hierBAPS [21] to assign clusters, however due to the  
146fact that all samples are included in the sequence clusters we found it was not appropriate for  
147this study question. We made the assumption that any strains taken from different patients  
148that were within sequence cluster constituted a possible transmission event.

149

#### 150***De novo* assembly**

151All samples underwent *de novo* assembly of bacterial genomes using SPAdes and pilon  
152wrapped in the Unicycler v0.4.4 package [22]. Assembled contigs were annotated using  
153prokka v1.13 [23] and comparison of the accessory genome was generated using roary  
154v3.12.0 [24]. To generate a list of genes that could be used to differentiate isolates the  
155annotated genes were filtered to remove coding sequences (CDS) greater than 8000 bp and  
156less than 250 bp, as well as those only present in a single sample and those present in every  
157sample.

## 158Results

### 159***M. abscessus* population distribution**

160We obtained whole genome sequences for 145 *M. abscessus* isolates from 62 patients. Thirty-  
161three *M. abscessus* from Barcelona subdivided into 24 *M. abscessus* subsp. *abscessus*, two  
162*M. abscessus* subsp. *bolletii* and seven *M. abscessus* subsp. *massiliense*. A hundred and  
163twelve *M. abscessus* from UK subdivided into 78 *M. abscessus* subsp. *abscessus*, one *M.*  
164*abscessus* subsp. *bolletii* and 33 *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Sample MLST definitions,  
165VNTR and AMR associated mutations are shown in supplementary table 2.

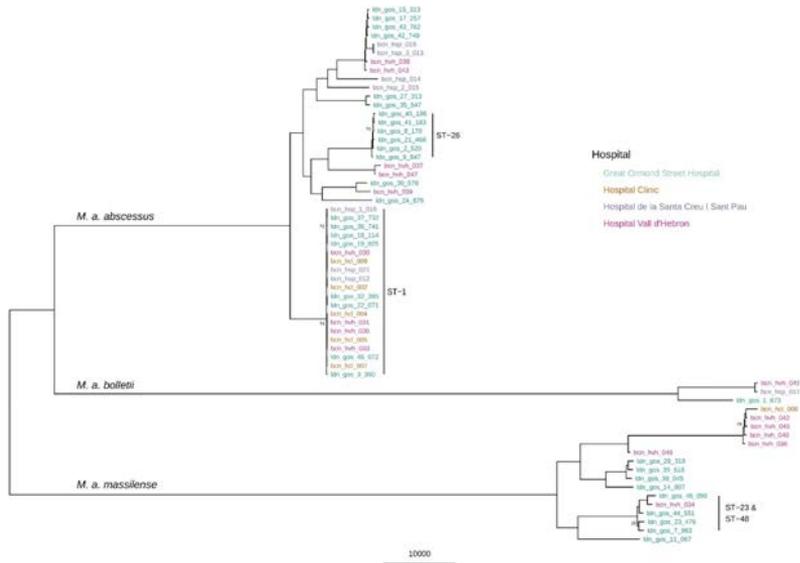
166

### 167**Transmission within *M. abscessus* clusters**

168To confirm transmission between patients we required their isolate genomes to be clustered  
169together by two independent methods and epidemiological evidence that both patients were at  
170the same hospital during the same time period. Using WGS data we inferred a phylogenetic  
171tree from reference genome SNV matrix for all patients (Figure 1). We observed two low  
172variant clusters of isolates that corresponded to ST-1 and ST-26 Pasteur MLST profiles  
173(VNTR II and I respectively), as well as other closely related *M. abscessus* *susp. massilense*  
174isolates between patients. We used a SNV matrix from mapping against a reference (*M.*  
175*abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977), as well as hierBAPS and rPinecone to predict  
176sequence clusters. The sequence clusters generated from the single reference SNV matrix  
177provided no further information than the MLST profiles, and in many cases provided  
178spurious findings with large groups of isolates clustered with no epidemiological link  
179(Supplementary Figure 1). This included large sequence clusters relating to a single MLST  
180type which included isolates from different hospitals and countries.

181Mapping to a single reference genome led to the inability of a single SNV cut-off, or model,  
182to exclude unrelated isolates from sequence clusters because the number of pairwise SNV  
183distances varied greatly between both subspecies and specific lineages which (Figure 2). For

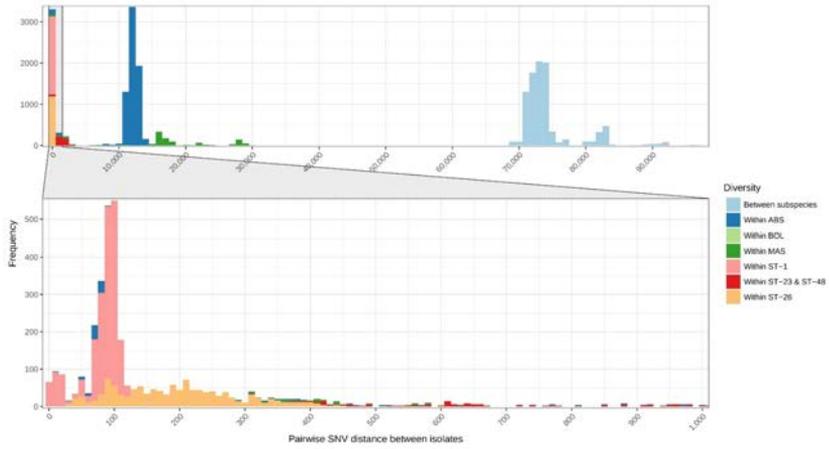
184example, the pairwise median (interquartile range) SNV distance between just ST-1 isolates  
185was 73 (62 – 81) compared to 29589 (27701 – 63703) for all *M. abscessus subsp. abscessus*  
186isolates. The same differences were seen in *M. abscessus subsp. massilense* as well with a  
187pairwise median (IQR) SNV distance between ST-23 and ST-48 isolates of 2084 (960 – 7274)  
188compared to 70545 (59947 – 71891) across all isolates from the subspecies.



189

190**Figure 1. Maximum likelihood single nucleotide variant (SNV) tree using only the**  
 191**earliest isolated sample from all 62 patients.** SNVs were identified from mapping reads to  
 192ATCC19977 *M. abscessus subsp. abscessus* reference genome. Sample names are highlighted  
 193in colour based on what hospital they were isolated from: Great Ormond Street Hospital,  
 194London, UK, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,  
 195Barcelona, Spain, and Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. The scale bar represents the  
 196number of single nucleotide variants and node bootstrap scores below are shown if below 75.

197



198

199**Figure 2. Frequency of pairwise single nucleotide variant (SNV) distances between all**  
 200**isolates.** SNVs were identified from mapping sequence reads to *M. abscessus* subsp.  
 201*abscessus* ATCC19977. The full plot includes all samples while the bottom subsidiary plot  
 202only includes isolates that have a pairwise difference between zero and 1000 SNVs.

203

#### 204 Sub-tree sequence clusters

205 Diversity across the population varied greatly due to subspecies and sequence type which  
206 hampered efforts to capture possible transmission events. In order to improve accuracy of  
207 sequence clustering, multiple sub-trees were made for closely related isolates using a more  
208 suitable reference sequence. We separated *M. abscessus subsp. abscessus* and *M. abscessus*  
209 *subsp. massilense* isolates, as well as further sub-trees for ST-1 (VNTR II), ST-26 (VNTR I)  
210 and ST-23/ST-48 (VNTR III) isolates. We also integrated the presence of accessory genes  
211 when interrogating possible sequence clusters for transmission (Figures 3, 4 & 5). Sequence  
212 clusters were assigned for each sub-tree using both a single SNV threshold (Supplementary  
213 Figure 2) and rPinecone. Overall we found that predicting transmission from the sub-trees  
214 reduced the number of different patients clustered together from 46 to 19 and the number of  
215 possible sequence clusters suggesting patient-to-patient transmission from 11 to seven.

216 A total of 18 sequence clusters (I – XVIII) were identified (listed in supplementary table 2),  
217 15 of these were within the sub-trees (I – XV), and seven clusters contained samples from  
218 more than one patient (IV, V, VI, VIII, XIV, XVI & XVII). All sequence clusters contained  
219 isolates from a single country with no evidence of international transmission. We found no  
220 evidence of transmission between patients within ST-26. (Figure 3). Within ST-1, four  
221 clusters (IV, V, VI and VIII) containing samples from more than one patient were found.  
222 Three of these clusters (IV, V and VI) contained isolates from nine patients from multiple  
223 hospitals within Barcelona. Only two of these patients were in hospital during the same time  
224 period (cluster VI: bcn\_hcl\_009 and bcn\_hvh\_30), but both were treated in different  
225 hospitals. Cluster VIII suggested transmission between two patients (gos\_18 and gos\_19)  
226 who were siblings with previously assumed direct transmission [12] (Figure 4). A single  
227 cluster (XIV) containing samples from two patients (gos\_46 and gos\_7) was found among g  
228 ST-23 isolates. However the two strains were isolated from samples taken nine years apart.  
229 Patient gos\_7 was already positive for *M. abscessus* on first admission to GOSH, and the two

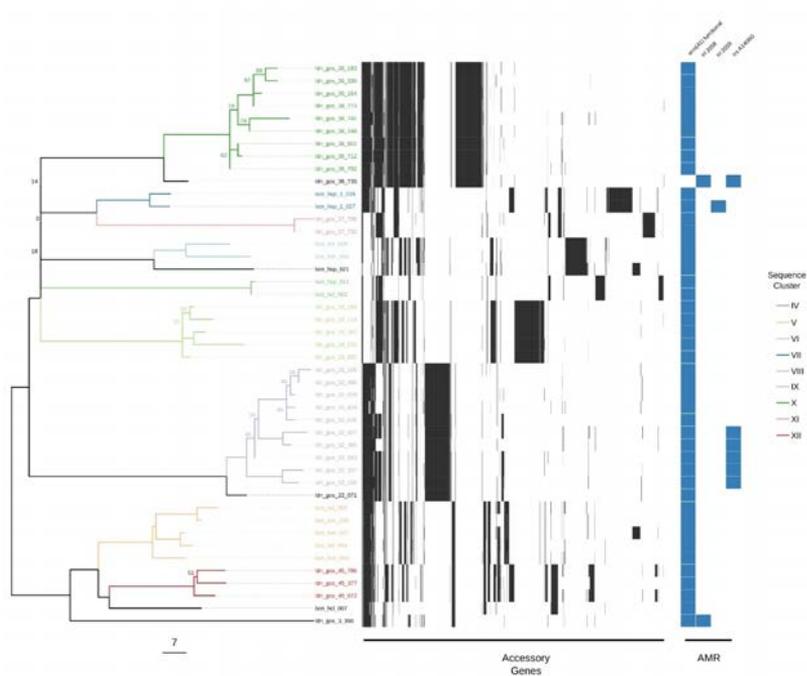
230 patients were present at GOSH at the same time on one occasion, 10 years before patient  
231 gos\_46 became infected with *M. abscessus* (Figure 5).

232 All samples found within their respective clusters also contained similar accessory gene  
233 profiles with the median (IQR) shared percentage of accessory genes within a sequence  
234 cluster being 89% (79% – 94%) compared to 18% (12% - 37%) for isolates not in the same  
235 sequence cluster.

236 For the 32 GOSH CF patients included in the study, 16 became infected with *M. abscessus*  
237 after their first visit to clinic (Supplementary Table 1), however transmission confirmed by  
238 both WGS and epidemiological data could only be identified in one case (gos\_19) thus  
239 suggesting a different route of acquisition for the rest of these patients.

240





253

254 **Figure 4. Maximum likelihood single nucleotide variant (SNV) tree for all ST-1 isolates.**

255 SNVs were identified from mapping reads to *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977.

256 Samples are highlighted based on inclusion in sequence clusters. The tree is annotated with

257 the presence (black) and absence (white) of accessory genes as well as the presence of AMR

258 associated genes and mutations. This included presence of a functional *erm(41)* gene

259 conferring inducible resistance to macrolides, presence of two *rrl* mutations conferring high

260 level macrolide resistance and the presence of mutation in *rrs* conferring high level amikacin

261 resistance. The scale bar represents the number of single nucleotide variants and node

262 bootstrap scores below are shown if below 75.

263

264



## 276 Discussion

277 This study has shown that whole genome sequencing of *M. abscessus* isolates can determine  
278 sub-species, identify AMR associated mutations and provide common typing definitions in a  
279 single workflow. This single method can replace the multiple existing multiple molecular  
280 assays used in clinical microbiology laboratories to provide the same information and could  
281 be used to predict novel resistance variants [25]. We used the WGS data to infer cross-  
282 transmission and found 43 (69%) patients had unique isolates that did not cluster with other  
283 patients. Seven sequence clusters contained non-unique isolates from the remaining 19  
284 patients but only one pair of patients (ldn\_gos\_18 and ldn\_gos\_19) had a plausible  
285 epidemiological link to support direct patient-to-patient transmission, as they were siblings.  
286 All other patients with genetically similar strains were either isolated in different countries,  
287 different hospitals or isolated from samples that were taken years apart, making direct  
288 transmission of these strains extremely unlikely.

289 Every *M. abscessus* isolated from a GOSH patient was sequenced and so the dataset  
290 generated represents a complete picture of *M. abscessus* infection in this hospital, which is  
291 vital for inferring transmission. Moreover, most of these patients were only attending clinics  
292 at GOSH, therefore this study has captured all of their *M. abscessus* isolates and they are  
293 unlikely to have been in contact with *M. abscessus* positive patients at other hospitals  
294 (Supplementary table 1). Therefore, if direct patient-patient transmission was occurring  
295 frequently we would expect to see evidence of it here. In contrast to this we found that the  
296 majority of patients in this study had unique strains and the majority of sequence clusters  
297 were multiple isolates from the same patients. This was despite the fact that many *M.*  
298 *abscessus* negative patients spent considerable time on the same wards as patients with  
299 ongoing *M. abscessus* infections.

300 We have therefore found that a fixed number of SNVs cannot be reliably used to infer cross-  
301 transmission across all *M. abscessus* isolates as there seems to be irreconcilable differences in

302the substitution rate between both sub-species and dominant clones. These difficulties are  
303similar to those seen in *Legionella pneumophila* outbreaks where the majority of cases can  
304belong to only a few sequence types [26]. *L. pneumophila* can also display different scales of  
305genetic diversity within different sequence or genotypes and so it is also recognised that a  
306single SNV threshold cut-off will not provide sufficient discriminatory power [27]. When  
307using WGS to infer relatedness in *M. abscessus* there has previously been an attempt to find  
308an absolute threshold which can rule in or rule out strains into a transmission event. This has  
309previously been placed as below 25-30 SNVs [8,26,27]. From our findings we would  
310advocate using a suitable genetically similar reference sequence when carrying out core  
311genome SNP calling, especially for the dominant clones such as ST-1 and ST-26. There is a  
312large amount of variation within the genomes of *M. abscessus* [28] and so the use of a single  
313reference such as *M. abscessus subsp. abscessus* ATCC 19977 will mask many differences  
314between strains and generate spurious clusters of genetically similar sequences. Where a  
315suitable reference isn't available we recommend using a high quality draft de-novo assembly  
316of the first isolated sample to compare other isolates against as in the example of the ST-26  
317samples in this study (Figure 3).

318In addition to core genome SNV analysis we have also found the integration of accessory  
319genome information is a useful indicator of relatedness within *M. abscessus* isolates that can  
320be used to further interrogate assigned sequence clusters. Generally there was good  
321concordance between the proportion of putative genes shared and the SNV distance between  
322two samples. This is helped by using a closely related reference sequences to map sequence  
323reads against. Despite this there were differences between the accessory genomes and AMR  
324profiles of closely related sequences such as patient ldn\_gos\_46 and patient ldn\_gos\_7  
325samples that were grouped together in sequence cluster XIV (Figure 5). We have seen in this  
326study, and previously [29], diversity in the accessory genome profiles as well as in the  
327number of SNPs and AMR associated mutations taken from multiple samples from the same

328patient on the same day. However we have always found inter-patient diversity to be greater  
329than that seen within the same patient. This would suggest that any direct transmission  
330between patients of even minority populations would still be identified by WGS and absence  
331of this provides further evidence that patient-to-patient transmission is not occurring within  
332this population.

333In agreement with previous studies we have found an international spread of *M. abscessus*  
334dominant clones [8]. We have found WGS to be useful to confirm whether different patient's  
335strains are unrelated, even within the dominant clones, but it has been far more difficult to  
336reach definite conclusions about cross-transmission. Without environmental samples we  
337cannot rule out the possibility of intermediate sources of infection and so WGS as a tool for  
338tracking cross-transmission in *M. abscessus* will only realise its full potential with proper  
339screening of environmental sources alongside longitudinal patient sampling.

340

#### 341**Funding**

342This work was supported by the National Institute for Health Research; EMBO Short-Term  
343Fellowship [7307 to M.R.] and the European Association of National Metrology Institutes  
344[15HLT07 to R.D.]

345

#### 346**Acknowledgements**

347We thank the Biomedical Scientist team at Great Ormond Street Hospital and Dr Julià  
348Gonzalez and Dr Teresa Tórtola for sample collection at Hospital Clinic and Hospital de la  
349Vall d'Hebron, respectively.

350

351

## 352References

353

3541. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly  
355 Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium*  
356 and Four Novel Genera. *Front Microbiol* **2018**; 9:67.

3572. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Benwill JL, Wallace RJ. *Mycobacterium abscessus*.  
358 'Pleased to meet you, hope you guess my name...' *Ann Am Thorac Soc* **2015**; 12:436–  
359 439.

3603. Chalermkulrat W, Sood N, Neuringer IP, et al. Non-tuberculous mycobacteria in end  
361 stage cystic fibrosis: implications for lung transplantation. *Thorax* **2006**; 61:507–513.

3624. Huang HC, Weigt SS, Derhovanessian A, et al. Non-tuberculous mycobacterium  
363 infection after lung transplantation is associated with increased mortality. *J Heart Lung*  
364 *Transplant* **2011**; 30:790–798.

3655. Robinson PD, Harris KA, Aurora P, Hartley JC, Tsang V, Spencer H. Paediatric lung  
366 transplant outcomes vary with *Mycobacterium abscessus* complex species. *European*  
367 *Respiratory Journal* **2013**; 41:1230–1232.

3686. Rubio M, March F, Garrigó M, Moreno C, Español M, Coll P. Inducible and Acquired  
369 Clarithromycin Resistance in the *Mycobacterium abscessus* Complex. *PLOS ONE*  
370 **2015**; 10:e0140166.

3717. Macheras E, Konjek J, Roux A-L, et al. Multilocus sequence typing scheme for the  
372 *Mycobacterium abscessus* complex. *Research in Microbiology* **2014**; 165:82–90.

3738. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, et al. Emergence and spread of a  
374 human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* **2016**;  
375 354:751–757.
3769. Davidson RM, Hasan NA, de Moura VCN, Duarte RS, Jackson M, Strong M.  
377 Phylogenomics of Brazilian epidemic isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp.  
378 *bolletii* reveals relationships of global outbreak strains. *Infect Genet Evol* **2013**; 20:292–  
379 297.
38010. Malcolm KC, Caceres SM, Honda JR, et al. *Mycobacterium abscessus* Displays Fitness  
381 for Fomite Transmission. *Appl Environ Microbiol* **2017**; 83.
38211. Pasipanodya JG, Ogbonna D, Ferro BE, et al. Systematic Review and Meta-analyses of  
383 the Effect of Chemotherapy on Pulmonary *Mycobacterium abscessus* Outcomes and  
384 Disease Recurrence. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
38512. Harris KA, Underwood A, Kenna DTD, et al. Whole-genome sequencing and  
386 epidemiological analysis do not provide evidence for cross-transmission of  
387 *mycobacterium abscessus* in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *Clin Infect Dis*  
388 **2015**; 60:1007–1016.
38913. N’Goma JCB, Moigne VL, Soismier N, et al. *Mycobacterium abscessus* Phospholipase  
390 C Expression Is Induced during Coculture within Amoebae and Enhances *M. abscessus*  
391 Virulence in Mice. *Infection and Immunity* **2015**; 83:780–791.
39214. Laencina L, Dubois V, Moigne VL, et al. Identification of genes required for  
393 *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus.  
394 *PNAS* **2018**; 115:E1002–E1011.

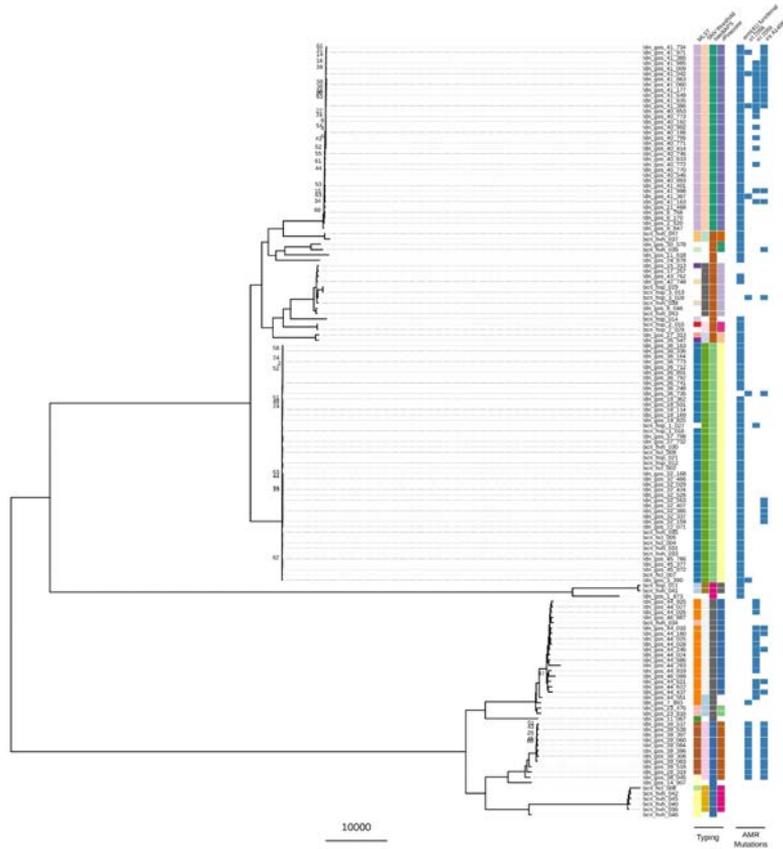
39515. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An Official ATS/IDSA Statement:  
396 Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J*  
397 *Respir Crit Care Med* **2007**; 175:367–416.
39816. Harris KA, Kenna DTD, Blauwendraat C, et al. Molecular fingerprinting of  
399 *Mycobacterium abscessus* strains in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *J Clin*  
400 *Microbiol* **2012**; 50:1758–1761.
40117. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing.  
402 arXiv:12073907 [q-bio] **2012**; Available at: <http://arxiv.org/abs/1207.3907>. Accessed 11  
403 September 2015.
40418. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples  
405 of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res*  
406 **2015**; 43:e15.
40719. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of  
408 large phylogenies. *Bioinformatics* **2014**; 30:1312–1313.
40920. Wailan AM, Coll F, Heinz E, et al. rPinecone: Define sub-lineages of a clonal expansion  
410 via a phylogenetic tree. *bioRxiv* **2018**; :404624.
41121. Tonkin-Hill G. rhierbaps: R implementation of hierBAPS. Contribute to  
412 gtonkinhill/rhierbaps development by creating an account on GitHub. 2018. Available  
413 at: <https://github.com/gtonkinhill/rhierbaps>. Accessed 3 September 2018.
41422. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome  
415 assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* **2017**;  
416 13:e1005595.

41723. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**;  
418 30:2068–2069.
41924. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome  
420 analysis. *Bioinformatics* **2015**; 31:3691–3693.
42125. Lipworth S, Hough N, Leach L, et al. Whole-Genome Sequencing for Predicting  
422 Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial Agents and*  
423 *Chemotherapy* **2019**; 63:e01204-18.
42426. Tortoli E, Kohl TA, Trovato A, et al. *Mycobacterium abscessus* in patients with cystic  
425 fibrosis: low impact of inter-human transmission in Italy. *Eur Respir J* **2017**; 50.
42627. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome  
427 sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on  
428 single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol*  
429 *Infect* **2018**; 24:350–354.
43028. Choo SW, Wee WY, Ngeow YF, et al. Genomic reconnaissance of clinical isolates of  
431 emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* reveals high evolutionary  
432 potential. *Scientific Reports* **2014**; 4:4061.
43329. Shaw LP, Doyle RM, Kavaliunaite E, et al. Children with cystic fibrosis are infected  
434 with multiple subpopulations of *Mycobacterium abscessus* with different antimicrobial  
435 resistance profiles. *Clin Infect Dis* **2019**;
- 436

437Supplementary material

438Supplementary table 1. Study patient information.

439Supplementary table 2. Information on all individual *M. abscessus* isolates included in  
440this study.

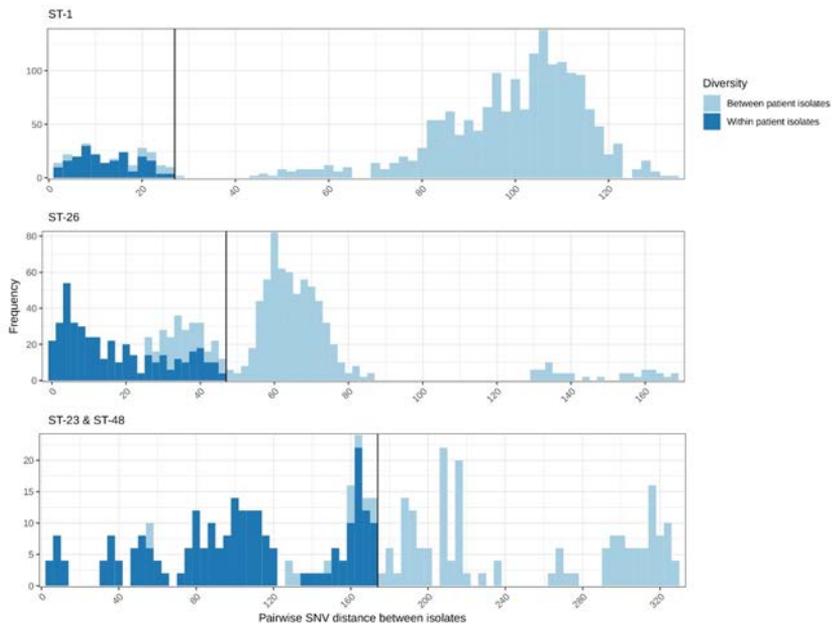


441

442Supplementary Figure 1. Maximum likelihood single nucleotide variant (SNV) tree for  
443all isolates in this study. The tree is annotated with sequence clusters that are defined either

444by (from left-to-right) MLST, SNV threshold, hierBAPS and rPinecone as well as the  
445presence of AMR associated gene and mutations. This included presence of a functional  
446*erm(41)* gene conferring inducible resistance to macrolides, presence of two *rrl* mutations  
447conferring high level macrolide resistance and the presence of mutation in *rrs* conferring high  
448level amikacin resistance. The scale bar represents the number of single nucleotide variants  
449and node bootstrap scores below are shown if below 75.

450



451

452 **Supplementary Figure 2. Frequency of pairwise single nucleotide variant (SNV)**  
453 **distances between samples after sub-tree analysis.** Figure 3A shows pairwise differences  
454 from the ST-1 subtree. Figure 3B shows pairwise differences from the ST-26 subtree. Figure  
455 3C shows pairwise differences from the ST-23 and ST-48 subtree.

## **Anexo III: Protocolos de extracción de ADN**

- **Protocolo 1.** Extracción por choque térmico. Utilizado para bacterias que vienen de medio de cultivo sólido.
  - Después de la inactivación, congelar los tubos con la suspensión de bacterias inactivadas de 200  $\mu$ l a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - Descongelar la suspensión de bacterias a temperatura ambiente.
  - Repetir el proceso 3 veces.
  - Calentar la suspensión a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
  - Traspasar el agua con el ADN en suspensión a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y guardar en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **Protocolo 2.** Extracción por matriz de InstaGene (BioRad). Utilizado para bacterias que vienen de cultivo en medio líquido o para muestras en las que el Protocolo 1 no se han obtenido los resultados esperados.
  - Centrifugar la suspensión bacteriana a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
  - Remover suavemente el reactivo *InstaGene Matrix* (BioRad) usando el imán que contiene con tal de mantener la matriz en suspensión.
  - Añadir 200  $\mu$ l del reactivo *InstaGene Matrix*.
  - Incubar en el baño a  $56^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

- Realizar un vórtex a máxima velocidad durante 1 minuto.
  - Hervir los tubos en una olla durante 8 minutos, sellando los tubos con parafilm para evitar que se destapen y evaporen.
  - Realizar un vórtex a máxima velocidad durante 1 minuto.
  - Centrifugar a 10.000 rpm durante 3 minutos.
  - Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y guardar en el congelador a - 20°C.
- 
- **Protocolo 3.** Extracción del ADN genómico para WGS.
    - Subcultivar las cepas en medio sólido tal y como se especifica en el apartado de cultivo.
    - Asegurar que el cultivo es puro, sino volver a subcultivar picando una colonia.
    - Coger un asa de bacterias del cultivo y resuspender en 0,5 ml de tampón AE de Qiagen en un tubo eppendorf de 1,5 ml.
    - La suspensión tiene que ser lo suficientemente turbia para asegurar la máxima extracción de ADN.
    - Introducir perlas de 0,1mm de grosor en el eppendorf donde están resuspendidas las bacterias.
    - Homogeneizar en el homogenizador Minilys (Bertin Instruments), 2 minutos a máxima revolución.
    - Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm.

- Transferir 200  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo de 2 ml de muestras EZ1 (Qiagen).
- Extraer el ADN utilizando el extractor automático de Qiagen EZ1 Advanced (Qiagen) con el kit de tejidos EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen) y eluir con 200  $\mu$ l (Qiagen & Technologies, 2011).
- Cuantificar el ADN utilizando el fluorómetro Qubit 4 para una cuantificación de alta pureza de ADN (ThermoFisher Scientific, disponible en su página web <https://www.thermofisher.com/es>).
- La cuantificación de ADN tiene que ser superior a 2 ng/ $\mu$ l. Si no es la esperada, repetir. Si no se puede repetir y la concentración es cercana a 2 ng/ $\mu$ l se puede concentrar la solución mediante evaporación a 55 °C hasta reducir el líquido a 50  $\mu$ l aproximadamente.

## **Anexo IV: Protocolo de amplificación por PCR**

Productos y reactivos:

6. Agua destilada estéril (Braun, España).
7. Iniciadores u oligonucleótidos específicos para cada gen.
8. Tampón 10X con cloruro de magnesio a concentración de 25 mM (Roche, España).
9. Tampón 10X sin cloruro de magnesio (Roche, España).
10. Cloruro de magnesio a concentración 25 mM (Roche, España).

11. Mezcla de dNTPs (desoxiribonucleótidos: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a concentración 10 mM (Roche, España).
12. Polimerasa TaqExpand a una concentración de 3,5 unidades/ $\mu$ l (Roche, España).

El protocolo de amplificación por PCR consta de dos partes:

**Pre-PCR:**

Preparación de la mezcla de reactivos de para la PCR o Master Mix en la zona de Pre-PCR. La zona de Pre-PCR es una zona limpia y aislada del resto del laboratorio donde se supone no hay contaminación de amplicones o productos de PCRs anteriores.

1. Preparar y rotular los tubos eppendorf de 200  $\mu$ l.
2. Preparar la mezcla de reactivos de la PCR para todas las muestras.
3. Calcular los volúmenes de reactivos para todas las muestras más el control positivo y negativo y contar una o dos muestras de más por el error cometido al pipetear.
4. Introducir el volumen total de agua destilada estéril.
5. Introducir el tampón de PCR (con o sin Magnesio, dependiendo del protocolo)
6. Introducir el Magnesio si se requiere.
7. Introducir el volumen total de iniciadores.
8. Introducir el volumen de polimerasa Taq Expand.
9. Repartir 22  $\mu$ l de la Master Mix en cada uno de los tubos eppendorf de 200  $\mu$ l.
10. Introducir 3  $\mu$ l de la extracción de ADN de la muestra.
11. Introducir los tubos eppendorff de 200  $\mu$ l en el termociclador.

12. Seleccionar el programa adecuado y ejecutar.
13. Una vez acabe el programa de termociclador, retirar los tubos y guardar en nevera hasta 3 semanas o congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Post PCR:**

Visualizar los productos amplificados de la PCR mediante gel de agarosa al 1%.

### **Tampones y reactivos para el protocolo de electroforesis:**

- Tampón de TBE:
  - 2 L de TBE 5X: 108 g de Trizma, 55 g de ácido bórico, 7,5 g de EDTA, y enrasar hasta los 2 L en la proveta con agua destilada estéril.
  - 1 L de TBE 0.5X: 100 ml TBE al 5X con 900 ml de agua destilada estéril.
- Tampón de carga: 0.124 g de Azul de Bromofenol, 25 ml de glicerol y se añade agua destilada hasta los 50 ml.
- Marcador de peso molecular (VIII): 75  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril, 10  $\mu\text{l}$  de tampón de carga y 1  $\mu\text{l}$  de DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche, España).

### **Elaboración del gel:**

1. Mezclar 200 ml de tampón TBE al 0,5X con 2 mg de agarosa MP.
2. Calentar a 900W durante 2 minutos.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

4. Añadir 5  $\mu\text{l}$  de Bromuro de Etidio y mezclar suavemente.
5. Verter la mezcla en el molde del gel.
6. Colocar los peines de plástico para crear los pocillos donde se introduce la muestra
7. Enfriar a temperatura ambiente hasta que se solidifique.
8. Retirar los peines y sumergir el gel en la cuveta de electroforesis en tampón TBE al 0,5X.

### **Cargar los amplicones en el gel:**

- Mezclar 3  $\mu\text{l}$  de amplicón con 9  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 3  $\mu\text{l}$  de tampón de carga.
- Introducir los 15  $\mu\text{l}$  de mezcla en los pocillos correspondientes del gel de electroforesis.
- Introducir el marcador molecular en los pocillos de los extremos.
- Correr el gel a un voltaje de 100 V los primeros 5 minutos y bajar a 70 - 90 V hasta que las bandas del marcador queden bien separadas. El voltaje y el tiempo dependen de la medida del amplicón esperado.
- Visualización del gel en el transiluminador de luz ultravioleta y realizar la fotografía.

## **Purificación de los productos amplificados o amplicones:**

**Protocolo 1.** Purificación con High Pure PCR Product Purification Kit:

1. Rotular y encajar una columna y un tubo contenedor del kit por cada una de las muestras a purificar.
2. Añadir: 250  $\mu$ l de Binding Buffer (tampón del kit) + 50  $\mu$ l de producto de PCR.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.
4. Descartar el líquido recogido.
5. Añadir 500  $\mu$ l de Washing Buffer (tampón del kit).
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.
7. Descartar el líquido recogido.
8. Añadir 200  $\mu$ l de Washing Buffer.
9. Centrifugar a 14.000 rpm.
10. Descartar el líquido recogido junto con el tubo recolector.
11. Poner la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml debidamente rotulado.
12. Añadir el líquido eluyente (Agua destilada estéril): de 10 a 40  $\mu$ l dependiendo la intensidad de banda observada en la electroforesis. Para una banda tenue poner 10  $\mu$ l (hay poco amplicón), mientras que para una banda muy fuerte poner 40  $\mu$ l (hay mucho amplicón).
13. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.
14. Guardar el producto amplificado en la nevera hasta 3 semanas o en el congelador a - 20 °C.

## Protocolo 2. ExoSAP-IT PCR Purification Cleanup Reagent:

1. Rotular 1 tubo eppendorf de 200 µl por cada muestra.
2. Mezclar 10 µl de producto de amplificación con 4 µl de ExoSAP-IT PCR Purification Cleanup Reagent.
3. Incubar en el termociclador con un ciclo de 37 °C durante 15 minutos y 80oC durante 15 minutos.
4. Guardar en nevera hasta 3 semanas o en el congelador a - 20 °C.

## Anexo V: Protocolos de PCR

Multiplicar el volumen a preparar por el número de muestras y añadir un control positivo y un control negativo (si se precisa, contar alguna muestra de más para evitar quedarse sin reactivo debido al pipetear).

Repartir 22 µl de la mezcla por tubo y añadir el ADN correspondiente (al control negativo añadir H<sub>2</sub>O destilada estéril).

### A. Identificación de subespecies:

Master Mix <i>rpoB</i>		Programa termociclador <i>rpoB</i>	
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	Desnaturalización	95 °C 10 min 1 ciclo
dNTPs (10 mM)	2,5 µl		94 °C 30 seg
Mycof (10µM)	5 µl	Anillamiento	60 °C 30 seg 35 ciclos
Mycor (10µM)	5 µl		72 °C 1:30 min
H <sub>2</sub> O destilada estéril	6,82 µl	Extensión final	72 °C 5 min 1 ciclo
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,18 µl		
ADN	3 µl		

Master Mix <i>secA1</i>	Volumen
Tampón 10x sin MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
<i>secA-F</i> (10 pmol/µl)	1,25 µl
<i>secA-R</i> (10 pmol/µl)	1,25 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	12,8 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,2 µl
ADN	3 µl

Master Mix <i>sodA</i>	Volumen
Tampón 10x + MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
SodlgF (10 pmol/µl)	2,5 µl
SodlgR (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Master Mix <i>hsp65</i>	Volumen
Tampón 10x + MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
SodlgF (10 pmol/µl)	2,5 µl
SodlgR (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	12,32 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,18 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador <i>secA1</i>			
Desnaturalización	95 °C	10 min	1 ciclo
	95 °C	30 seg	
Anillamiento	64 °C	30 seg	30 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

Programa termociclador <i>sodA</i>			
Desnaturalización	95 °C	2 min	1 ciclo
	95 °C	30 seg	
Anillamiento	57 °C	30 seg	35 ciclos
	72 °C	120 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo

Programa termociclador <i>hsp65</i>			
Desnaturalización	94 °C	3 min	1 ciclo
	94 °C	60 seg	
Anillamiento	60 °C	60 seg	45 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

## B. Base molecular de la resistencia a macrólidos:

Master Mix <i>erm(41)</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
<i>ermF</i> (10 pmol/µl)	2,5 µl
<i>ermR</i> (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Master Mix <i>rrl</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
19F (10 pmol/µl)	2,5 µl
21R (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,8 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,2 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador <i>erm(41)</i>			
Desnaturalización	95 °C	5 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	62 °C	60 seg	35 ciclos
	72 °C	1:30 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

Programa termociclador <i>rrl</i>			
Desnaturalización	95 °C	5 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	55 °C	60 seg	35 ciclos
	72 °C	1:30 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

## C. Base molecular de la resistencia a aminoglucósidos:

Master Mix <i>rrs</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
<i>rrs</i> 1-F (10 pmol/µl)	2,5 µl
<i>rrs</i> 1-R (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Master Mix <i>aac</i> (2')	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
<i>Aac</i> 2-ExtF (10 pmol/µl)	2,5 µl
<i>Aac</i> 2-ExtR (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Master Mix <i>rpsL</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
<i>RpsL</i> -F (10 pmol/µl)	2,5 µl
<i>RrpsL</i> -R (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador <i>rrs</i>			
Desnaturalización	95 °C	2 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	58 °C	30 seg	35 ciclos
	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

Programa termociclador ( <i>aac</i> 2')			
Desnaturalización	95 °C	2 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	57 °C	30 seg	35 ciclos
	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo

Programa termociclador <i>rpsL</i>			
Desnaturalización	95 °C	2 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	59 °C	30 seg	35 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo

## D. Base molecular de la resistencia a fluoroquinolonas:

Master Mix <i>gyrA</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
GyrA-F (10 pmol/µl)	2,5 µl
GyrA-R (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Master Mix <i>gyrB</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
GyrB-F (10 pmol/µl)	2,5 µl
GyrB-R (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,8 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,2 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador <i>gyrA</i>			
Desnaturalización	94 °C	5 min	1 ciclo
	94 °C	60 seg	
Anillamiento	63 °C	1:30 min	35 ciclos
	72 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

Programa termociclador <i>gyrB</i>			
Desnaturalización	94 °C	5 min	1 ciclo
	94 °C	60 seg	
Anillamiento	61 °C	60 seg	35 ciclos
	72 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

## E. Base molecular de la resistencia a oxazolidinonas:

Master Mix <i>rpIC</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
RpIC-F (10 pmol/µl)	2,5 µl
RrpIC-R (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Master Mix <i>rpID</i>	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
RpID-F (10 pmol/µl)	2,5 µl
RrpID-R (10 pmol/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	11,86 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador <i>rpIC</i>			
Desnaturalización	95 °C	2 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	59 °C	30 seg	35 ciclos
	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo

Programa termociclador <i>rpID</i>			
Desnaturalización	95 °C	2 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	59 °C	30 seg	35 ciclos
	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo

## **Anexo VI: Preparación de librerías genéticas**

1. Fragmentamos 50 ng de ADN total de las extracciones anteriores utilizando el Nextera Library Preparation Kit (Illumina) para el secuenciador NextSeq 500 System.
2. La preparación de la librería se realizó siguiendo los pasos indicados por Illumina en la guía Nextera Library Preparation Reference Guide (Illumina Inc., 2016).
3. Utilizamos perlas magnéticas Ampure XP beads (Beckam) para seleccionar un tamaño de fragmentos de 500 a 2000 pb.
4. Determinamos el tamaño y la calidad de los fragmentos de ADN usando la plataforma Agilent 2200 TapeStation con los cartuchos Agilent D5000 ScreenTape System (Willoughby, Australia).
5. Las librerías de fragmentos fueron agrupadas de forma equimolar en el paso final de agrupar las librerías.
6. Cargamos 1,8 pM de librerías agrupadas en el secuenciador Illumina NextSeq 550 para una secuenciación de 150 pb.

# Anexo VII: Script para el estudio de *M. abscessus* por WGS

```
#Todos los programas utilizados están en el ordenador y están en el PATH para
poder utilizarlos
#Las secuencias de referencia así como otros archivos que se utilizan en este
script están en la carpeta MABS situada en /home
#Partimos de los datos obtenidos del secuenciador y convertidos a
archivos.fastq.gz por el programa bcl2fastq de Illumina

#Esto es para trimmear los adaptadores

for R1 in *R1*.fastq.gz
do echo $R1
R2=`echo $R1 | sed 's/ R1 / R2 /'`
trim_galore --length 50 --paired $R1 $R2
done

#Esto es para eliminar las secuencias duplicadas y unir las secuencias forward con
las reverse en un único archivo.fastq.gz

for R1 in *R1*.gz
do echo $R1
R2=`echo $R1 | sed 's/ R1 / R2 /' | sed 's/val_1/val_2/'`
bname=`echo $R1 | sed 's/_R.\+//'`
dedupe.sh -Xmx20g in=$R1 in2=$R2 csf=$bname.dedup.stats out=$bname.fastq.gz
done

#Crear un archivo de alineamiento .sam y pasarlo a .bam para reducir el peso

for i in *.fastq.gz
do echo $i
bname=`echo $i | sed 's/\.fastq\.gz//'`
bbmap.sh -Xmx20g in=$i out=stdout ref=/home/MABS/ATCC19977_complete_genome.fasta
interleaved=true pairedonly=t pairlen=1000 slow=t statsfile=$bname.stats |
samtools view -@7 -bS -F 4 | samtools sort -@7 > $bname.bam.sort.bam
done

#Marcar y eliminar las secuencias exactamente iguales

for x in *.bam
do java -jar /PATH_to_program/picard.jar MarkDuplicates REMOVE_DUPLICATES=true I=
$x M= $x.duplication_metrics O= $x.nodup.bam
done

for x in *.nodup.bam
do echo $x
bname=`echo $x | sed 's/\.bam\.nodup\.bam//'`
java -jar /PATH_to_program/picard.jar AddOrReplaceReadGroups LB=m_abscessus_Marc
PL=illumina PU=m_abscessus SM=$bname I=$x O=$x.1.bam
done

#Aquí hacemos una comprobación de como se han mapeado las secuencias utilizando la
herramienta multiqc

for x in *.1.bam
do qualimap bamqc -ip -outformat HTML -sd -bam $x --java-mem-size=20G
done

multiqc -fv -o multiqc_result/ .

#Aquí lo que hacemos es indizar nuestras secuencias con la de referencia

for i in *.1.bam
do samtools index $i
done

#Esto es para comparar los SNPs utilizando FreeBayes, aquí se ejecuta el Variant
Calling creando un archivo.vcf

for i in *.1.bam; do echo $i; freebayes -f /home/microbiologia/mrubio/MABS/
ATCC19977_complete_genome.fasta -F 0.4 -m 30 -q 20 -p 1 -i -u $i > $i.vcf; done
```

```

#Aquí filtramos el resultado anterior

for i in *.vcf; do echo $i; vcffilter -f "SAF > 2 & SAR > 2 & RPL > 2 & RPR > 2 &
A0 > 4 & ! ( TYPE = ins ) & ! ( TYPE = del ) & ! ( TYPE = complex )" $i >
$i.filtered.vcf; done

#Aquí miramos la profundidad de las lecturas en los reads

for x in *.bam; do echo $x; bedtools genomecov -ibam $x -bga | awk '$4 < 5' >
$x.depth; done

#Unimos las profundidades de las muestras

cat *.depth > merged.depth.bed

#Aquí miramos cuales son las partes que son iguales en todas las muestras y las
marcamos

for i in *.filtered.vcf; do echo $i; bedtools intersect -header -wa -v -a $i -b
merged.depth.bed > $i.sharesites.vcf; done

#Pasamos el archivo.vcf a archivo.fasta

for i in *.sharesites.vcf
do echo $i
PREFIX=`echo $i | sed
's/.bam.sort.bam.nodup.bam.1.bam.vcf.filtered.vcf.sharesites.vcf//`
vcf2fasta -f /home/MABS/ATCC19977_complete_genome.fasta -p $PREFIX -P 1 $i
done

for i in *0.fasta
do echo $i
NEW=`echo $i | sed 's/_S.\+/.fasta/`
mv $i $NEW
done

#Enmascaramos todas las partes que son iguales en todas las muestras

for x in *.fasta
do echo $x
bedtools maskfasta -fi $x -fo $x.cov.fasta -bed merged.depth.bed
done

#Editamos el header del archivo.fasta

for i in *cov.fasta
do echo $i
HEAD=`echo $i | sed 's/.fasta.cov.fasta//`
sed -i -e "s/>CU458896.1/>$HEAD/" $i
done

#Unimos todas las muestras (archivos.fasta) en uno solo donde tenemos un
alineamiento en un archivo multi fasta

cat *cov.fasta > all_samples.fasta

#Ejecutamos Gubbins para quitar los efectos de recombinación

run_gubbins.py --verbose --filter_percentage 99 --threads 16 all_samples.fasta

#Utilizando el programa RAxML para crear el árbol de Maximum Likelihood

raxmlHPC -s all_samples.filtered_polymorphic_sites.fasta -n
abs_tree_bcn_allsamples_nrecom -T 15 -m GTRCAT -p 5000 -x 5000 -N 99 -f a

#Utilizamos figtree para visualizar el árbol y exportarlo a imagen

java -jar /PATH_to_program/FigTree_v1.4.3/lib/figtree.jar

```

## **Anexo VIII: Protocolo para el estudio de la sensibilidad antibiótica**

### **E-test:**

1. Partiendo de cultivo sólido.
2. Picar de 2 a 3 colonias con un asa de siembra.
3. Diluir las colonias en 100 µl de agua destilada estéril.
4. Depositar los 100 µl con las bacterias en una placa de agar Müller-Hinton 7H11.
5. Sembrar con escobillón para diseminar por toda la superficie de la placa.
6. Colocar la tira de E-test.
7. Incubar en estufa a 30 °C durante 3 días. A excepción de la Claritromicina cuya lectura es a los 3, 7 y 14 días.
8. A los 3 días observar el crecimiento y anotar la CMI.

### **Microdilución en placa de Sensititre en CAMHB (caldo ajustado de cationes Müller-Hinton)**

1. Partiendo de cultivo sólido.
2. Preparar un tubo de 10 ml con 5 ml de agua destilada estéril.
3. Emulsionar efusivamente en agua destilada las colonias que se precisen para obtener una concentración de bacterias al 0.5 McFarlan.
4. Se precisa un inóculo de aproximadamente  $5 \times 10^8$  ufc/ml (unidades formadoras de colonias).
5. Introducir 50 µl de las colonias ajustadas a 0.5 McFarlan en un tubo de CAMHB de 10 ml.
6. Vortear para mezclar.

7. Introducir 50 µl en cada pozo de la placa Sensititre.
8. Sellar la placa con el papel adhesivo.
9. Incubar en estufa a 30 °C durante 3 días hasta la lectura.  
A excepción de la Claritromicina cuya lectura es a los 3, 7 y 14 días.  
A los 3 días observar el crecimiento en el control positivo y anotar la CMI.

## **Anexo IX: Protocolo para el estudio epidemiológico por VNTR de *M. abscessus***

### **A. Amplificación por PCR**

La técnica de PCR es la misma que la descrita en el Anexo VIcon 2 variaciones:

Los iniciadores marcados con el fluorómetro deben permanecer el menor tiempo posible expuestos a la luz. Utilizar un papel de aluminio para tapar los tubos.

HotStartTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen) 250 U (IZASA).

Master Mix VNTR	Volumen	Programa termociclador VNTR			
PCR Buffer10x	2 µl	Desnaturalización	95 °C	15 min	1 ciclo
Q-solution (5X)	4 µl		95 °C	60 seg	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.2 µl	Anillamiento	59 °C	60 seg	30 ciclos
dNTPs (10mM)	0.4 µl		72 °C	1:30 min	
Inicidor marcado (4 µM)	0.4 µl				
Iniciador no marcado (20 µM)	0.4 µl				
Hot StarTaq polimerasa	0,15 µl				
Agua destilada	9,5 µl				
ADN	2 µl	Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

La mezcla de la *Master Mix* y las condiciones de los ciclos en el termociclador son iguales para todos los fragmentos.

## **B. Separación y detección de los productos amplificados**

1. En un tubo eppendorf nuevo de 200  $\mu$ l hacer diluciones 1:20 de los productos amplificados. Mezclar 2  $\mu$ l de amplicón con 38 de agua destilada. Mantener los tubos el menor tiempo posible expuestos a la luz.
2. Por cada muestra: mezclar 8,2  $\mu$ l de formamida + 0.3  $\mu$ l de marcador LIZ600. Preparar en un tubo eppendorf de 1,5 ml el volumen necesario para analizar todas las muestras contando 1 o 2 muestras de más para paliar el error de pipetera.
3. Repartir 8,5  $\mu$ l de la mezcla en tubos eppendorf de 200  $\mu$ l y añadir en cada tubo 1 $\mu$ l de amplicones.

## **C. Tabla del Dr. Wong para el cálculo de perfiles VNTR a partir de la longitud en pb del amplificado**

Locus	Predicted Fragment Sizes for MaVA (bp)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>TR2</b>	92	125	158	191	224	257	290	323	356	389	422
<b>TR28</b>	169	196	223	250	277	304	331	358	385	412	439
<b>TR45</b>	110	142	174	206	238	270	302	334	366	398	430
<b>TR57</b>	143	271	399	527	655	783	911	1039	1167	1295	1423
<b>TR86</b>	139	172	238	271	304	337	370	403	436	469	502
<b>TR101</b>	184	217	250	283	316	349	382	415	448	481	283
<b>TR104</b>	124	154	184	214	244	274	304	334	364	394	424
<b>TR109</b>	128	160	192	224	256	288	320	352	384	416	448
<b>TR116</b>	114	147	180	213	246	279	312	345	378	411	444
<b>TR120</b>	168	198	228	258	288	318	348	378	408	438	468
<b>TR124</b>	188	242	296	350	404	458	512	566	620	674	728
<b>TR131</b>	160	190	220	250	280	310	340	370	400	430	460
<b>TR137</b>	124	157	190	223	256	289	322	355	388	421	454
<b>TR139</b>	132	164	196	228	260	292	324	356	388	420	452
<b>TR149</b>	130	163	196	229	262	295	328	361	394	427	460
<b>TR150</b>	107	137	167	197	227	257	287	317	347	377	407
<b>TR155</b>	134	165	196	227	258	289	320	351	382	413	444
<b>TR163</b>	99	129	159	189	219	249	279	309	339	369	399
<b>TR167</b>	157	190	223	256	289	322	355	388	421	454	487
<b>TR172</b>	125	155	185	215	245	275	305	335	365	395	425
<b>TR179</b>	106	139	172	205	238	271	304	337	370	403	436
<b>TR198</b>	165	318	471	624	777	930	1083	1236	1389	1542	1695
<b>TR200</b>	191	218	245	272	299	326	353	380	407	434	461

# Anexo X: Protocolo para el estudio epidemiológico por MLST de *M. abscessus*

## Amplificación por PCR

La amplificación por PCR de los genes estudiados para el perfil de MLST se realiza de igual forma que la anterior descrita en el Anexo V.

### **Protocolo PCR MLST I para los genes *argH*, *glpK* y *gnd*:**

Master Mix MLST I	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Iniciador-F (10 pmol/µl)	1 µl
Iniciador-R (10 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	15,36 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador MLST I			
Desnaturalización	94 °C	5 min	1 ciclo
	94 °C	60 seg	
Anillamiento	58 °C	60 seg	30 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

### **Protocolo PCR MLST II para el gen *purH*:**

Master Mix MLST II	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
PurH-F (10 pmol/µl)	0,5 µl
PurH-R (10 pmol/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	16,36 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador MLST II			
Desnaturalización	94 °C	5 min	1 ciclo
	94 °C	60 seg	
Anillamiento	58 °C	60 seg	30 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

### **Protocolo PCR MLST III para el gen *pta*:**

Master Mix MLST III	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
pta-F (10 pmol/µl)	1 µl
pta-R (10 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	15,36 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador MLST III			
Desnaturalización	94 °C	5 min	1 ciclo
	94 °C	60 seg	
Anillamiento	60 °C	60 seg	30 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

### **Protocolo PCR MLST IV para el gen *cya*:**

Master Mix MLST IV	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
PurH-F (10 pmol/µl)	0,5 µl
PurH-R (10 pmol/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	16,36 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador MLST IV			
Desnaturalización	94 °C	5 min	1 ciclo
	94 °C	60 seg	
Anillamiento	55 °C	60 seg	30 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

### **Protocolo PCR MLST V para el gen *murC*:**

Master Mix MLST V	Volumen
Tampón 10x +MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
pta-F (10 pmol/µl)	1 µl
pta-R (10 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril	15,36 µl
Taq Expand (3,5 U/µl)	0,14 µl
ADN	3 µl

Programa termociclador MLST V			
Desnaturalización	95 °C	5 min	1 ciclo
	95 °C	60 seg	
Anillamiento	50 - 55 °C	60 seg	30 ciclos
	72 °C	60 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

**Anexo XI: *Script* para extraer los genes específicos de *M. abscessus* para obtener el perfil de MLST**

```

#Extraer los genes del archivo.bam. Tomamos como ejemplo el gen purH. Para cada
gen se tiene que cambiar las coordenadas de posición en la secuencia de referencia

for i in *.bam
do echo $i
samtools view -b -f 0x2 $i CU458896.1:1074479-1075027 > $i.purH.bam
done

#Extraer fastq del .bam

for i in *.purH.bam; do echo $i; samtools mpileup -uf
ATCC19977_complete_genome.fasta $i | bcftools call -c --ploidy 1 | vcfutils.pl
vcf2fq > $i.consensus.fq; done

#Cambiar de fastq a fasta

for i in *.fq
do
echo $i
awk '/^@CU458896.1$/ ,/^+$/ ' $i | perl -pe "s/@/> / ; s/\+// " > $i.fasta
done

for i in *.fq.fasta
do
echo $i
NAME=`echo $i | sed
's/.bam.sort.bam.nodup.bam.1.bam.purH.bam.consensus.fq.fasta//`
sed 's/n//gI' $i | sed '/^$/d' > $NAME.purH.fasta
done

#Eliminar los archivos intermedios

rm *.consensus.fq
rm *.consensus.fq.fasta
rm *.purH.bam

#Cambiar el header de los archivos.fasta

for i in *.purH.fasta
do
echo $i
awk '/>/{sub(">", "&FILENAME_");sub(/\.fasta/,x)}1' "$i" > "$i".purH.fasta
done

#Copiar los genes de todas las cepas en un directorio nuevo

mv *.fasta.purH.fasta /PATH_al_directorio/purH_gene/

#Eliminar los archivos.fasta con el header antiguo

rm *.purH.fasta

#Alinear todos los genes de todas las cepas para después poder subirlo a la base
de datos de MSLT y que nos dé un perfil

cat *fasta.purH.fasta > all_samples_purH.fasta

```

## Anexo XII: Tabla de CMIs para todas las cepas estudiadas

Paciente	Número de laboratorio	Identificador	CLR**	AMI	TOB	CIP	MXF	LNZ	TGC	SXT	IMI	AUG	FOX	FEP	AXO	DOX	MIN
1	07 011	bcn-hsp-013	0,5	8	8	>4	8	8	0,06	>8152	>64	>64/62	>128	>32	>64	>16	>8
2	09 152	bcn-hsp-015	16	8	4	>4	4	32	0,5	8152	>64	64/32	32	>32	>64	>16	>8
3	09 380	bcn-hsp-016	>16	4	4	1	2	<1	0,03	2/38	<2	64/32	32	32	32	>16	8
5	00 031	bcn-hsp-011	>16	4	4	4	4	16	0,12	8152	32	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
6	14 016*	N/A	>16														
9	08 420	bcn-hsp-012	>16	8	8	4	8	16	0,12	8152	8	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
13	01 019	bcn-hsp-014	>16	8	8	>4	8	8	0,12	>8152	16	>64/62	32	>32	64	>16	>8
14	14 019	bcn-hsp-019	0,5	16	4	>4	>8	16	0,25	>8152	64	>64/62	64	>32	>64	>16	>8
16	N/A	bcn-hsp-021	>16	16	4	2	8	16	0,25	>8152	4	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
17	N/A	bcn-hcl-001	2	8	8	>4	8	16	0,06	8152	8	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
18	N/A	bcn-hcl-002	>16	16	4	>4	>8	32	0,12	8152	8	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
19	N/A	bcn-hcl-003	>16	8	4	4	4	8	0,12	8152	4	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
20	N/A	bcn-hcl-004	>16	8	4	2	>8	16	0,5	8152	8	>64/62	64	>32	>64	>16	>8
21	N/A	bcn-hcl-005	>16	16	4	>4	8	16	0,12	>8152	64	>64/62	64	>32	>64	>16	8
22	N/A	bcn-hcl-006	0,5	8	4	>4	8	4	0,5	>8152	>64	>64/62	64	>32	32	>16	>8
23	N/A	bcn-hcl-007	>16	16	4	>4	>8	16	0,12	>8152	8	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
24	N/A	bcn-hcl-008	2	16	4	>4	>8	32	0,5	>8152	16	>64/62	64	>32	>64	>16	>8
25	N/A	bcn-hcl-009	>16	8	8	>4	4	4	1	8152	32	32/16	64	>32	>64	>16	>8
26	N/A	bcn-hwh-030	>16	16	4	2	4	16	0,12	4/76	4	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
27	N/A	bcn-hwh-031	16	16	8	>4	>8	16	0,5	>8152	>64	>64/62	128	>32	>64	>16	>8
28	N/A	bcn-hwh-033	>16	16	16	>4	>8	32	0,12	>8152	>64	>64/62	128	>32	>64	>16	>8
29	N/A	bcn-hwh-031	1	16	8	>4	>8	32	0,25	>8152	32	>64/62	64	>32	>64	>16	>8
30	N/A	bcn-hwh-035	>16	64	>16	>4	>8	32	0,5	>8152	32	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
31	N/A	bcn-hwh-035	>16	>64	>16	>4	>8	32	1	>8152	32	>64/62	64	>32	>64	>16	>8
32	N/A	bcn-hwh-037	>16	8	8	0,5	4	8	0,03	4/76	4	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
33	N/A	bcn-hwh-038	0,25	16-32	16	>4	2-4	2	0,12	2/38	64	>64/62	64	>32	>64	>16	>8
34	N/A	bcn-hwh-039	>16	>64	>16	>4	>8	32	0,06	>8152	16	>64/62	64	>32	64	>16	>8
35	N/A	bcn-hwh-040	0,5	16	4	1	2	8	0,03	8152	8	64/32	32	32	64	>16	8
36	N/A	bcn-hwh-041	>16	4	4	>4	8	16	0,25	>8152	8	64/32	32	32	64	>16	8
37	N/A	bcn-hwh-042	0,5	8	4	>4	8	8	0,03	>8152	8	64/32	64	32	64	>16	>8
38	N/A	bcn-hwh-043	0,5	16	8	4	4	2	0,06	8152	16	>64/62	32	>32	>64	>16	>8
39	N/A	bcn-hwh-045	1	8	4	1	4	8	0,06	4/76	4	>64/62	32	32	64	>16	>8
40	N/A	bcn-hwh-046	0,5	32	16	>4	>8	16	0,12	>8152	16	>64/62	64	>32	>64	>16	>8
41	N/A	bcn-hwh-047	>16	8	4	4	4	16	0,06	>8152	8	64/32	32	32	64	>16	8

\*\* Las CMIs de la claritromicina son las lecturas a los 14 días o la lectura en cuanto se volvió resistente.

<sup>A</sup> Estas lecturas son las de los 3 días.

<sup>B</sup> Estas cepas sólo se les pudo realizar el test de susceptibilidad a la claritromicina.

<sup>C</sup> Estas cepas no se les pudo realizar ningún test de susceptibilidad, sólo se dispuso de la extracción de ADN.

\* Las abreviaciones son: MABS, para *Mycobacterium abscessus* subsp. abscessus; MAS, para *Mycobacterium abscessus* subsp. massiliense; BOL, para *Mycobacterium abscessus* subsp. bolletii; SXT, para trimetoprim-sulfametoxazol; LND, para linezolid; CIP, para ciprofloxacino; IMI, para imipenem; MXF, para moxifloxacina; FEP, para cefepime; FOX, para ceftioxitina; AUG, para augmentine; AMI, para amicacina; TOB, para tobramicina; AXO, para ceftriaxona; DOX, para doxiciclina; MIN, para minociclina; TIG, para tigeciclina; y CLR, para claritromicina.

