

Revisiones

Mecanismos de resistencia en micobacterias de crecimiento rápido

Resistance mechanisms of rapid growing mycobacteria

OMAIRA J DA MATA J^{1,2}, SANDRA FERNÁNDEZ F², MARGARITA RODRÍGUEZ¹, JACOBUS H DE WAARD³

RESUMEN

Las Micobacterias de crecimiento rápido (MCR) son patógenos oportunistas capaces de ocasionar infecciones en piel, pulmonares y diseminadas. En Venezuela existe un incremento de estas infecciones derivadas de procedimientos invasivos, entre ellas cirugías estéticas. El tratamiento de esas infecciones requiere la administración de al menos dos antibióticos por varios meses. En la presente revisión se describe los mecanismos de resistencia a los antibióticos que se han reportado en las MCR, principalmente las tres especies que frecuentemente se han asociado a infecciones en piel: *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*. Los factores más importantes relacionados a la resistencia en los esquemas de tratamiento son: cambios relacionados en la permeabilidad de la membrana al antibiótico, la inactivación enzimática y modificaciones del sitio blanco. En MCR se han evidenciado la presencia de betalactamasas con actividad penicilinasas y cefalosporinasas y de acetil-transferasas que pueden modificar los aminoglicósidos. Las modificaciones de las regiones ARNr 23S y ARNr 16S han permitido explicar, en parte, la resistencia a macrólidos y aminoglicósidos. La metilación de los sitios blanco de acción de los macrólidos es otro factor importante, sobre todo en especies como *M. abscessus*. Éste último mecanismo explica la falla terapéutica que se ha reportado en pacientes tanto en infecciones pulmonares como en infecciones en piel. Es necesario ampliar el estudio sobre los mecanismos de resistencia en estas especies, tomando en consideración las complicaciones que llevan estas infecciones y los tiempos prolongados de tratamientos pudiendo generar efectos secundarios en los pacientes y la frustración cuando ocurre la falla terapéutica.

Palabras clave: Micobacterias de crecimiento rápido (MCR), mecanismos de resistencia a antibióticos, micobacteriosis

ABSTRACT

The rapid growing mycobacteria (RGM) are opportunist pathogens able to cause skin, pulmonary and disseminated infections. In Venezuela there is an increase in the prevalence of these infections especially following esthetic surgery. The treatment of such infections is cumbersome requiring the administration of at least two antibiotics for several months. In the present review we describe the principal antibiotic resistance mechanisms reported for RGM, particular for the species most frequently associated with skin and soft tissue infection: *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum*. The most important factors associated with resistance to antibiotics are impermeability of the cell membrane, enzymatic inactivation and changes in the target site. In RGM the presence of the beta-lactamases with penicillinases and cephalosporinase activity has been demonstrated and the presence of acetyl-transferases which can modify aminoglycosides. Changes in the 23S rRNA and 16S rRNA regions has allowed to explain, partly macrolide and aminoglycoside resistance. Mutation in the macrolide target site is another important resistance mechanism, particularly for the species group *M. abscessus*. This last mechanism can explain treatment failure reported in the patients with pulmonary or skin infection. We conclude that there is a need for more extensive studies about the mechanisms of antibiotic resistance of RGM; taking into account the complications of these infections, the prolonged treatment long time, producing secondary effects and the frustrations of patient and physician caused by therapeutic failures.

Keywords: rapid growing mycobacteria (RGM), antibiotic resistance mechanisms, mycobacteriosis

1 Universidad Simón Bolívar, Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana 2 Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Laboratorio de Diagnósticos Especiales, 3 Instituto de Biomedicina, Laboratorio de Tuberculosis. Correo electrónico: damataomaira@gmail.com

Las micobacterias son microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium*, que tienen la particularidad de retener en su pared la fucsina fenicada a pesar de someterlas a la acción de decolorantes, esta característica es denominada ácido resistencia. Actualmente se reconocen más de 170 especies dentro de este género, las cuales están clasificadas en dos grupos las de crecimiento rápido, que tienen un desarrollo bacteriano antes de 7 días de incubación en medios de cultivo y las de crecimiento lento (MNTCL), que requieren un tiempo mayor⁽¹⁾. Las micobacterias de crecimiento rápido (MCR) pueden ocasionar infecciones en piel y tejido blando y su prevalencia es similar a nivel mundial, siendo *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* las más frecuentes. En Venezuela se han reportado brotes relacionados a procedimientos invasivos, con gran relevancia los relacionados con procedimientos estéticos. Igualmente los brotes pueden asociarse a infecciones pulmonares y diseminadas⁽²⁻⁶⁾.

En las últimas décadas se ha incrementado el interés en los mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de las micobacterias no tuberculosas (MNT). El esquema de tratamiento de la micobacteriosis es diferente para cada especie y requiere la combinación de, al menos, dos antibióticos. Por otro lado, los tiempos prolongados de los esquemas de tratamiento y las fallas terapéuticas que se han reportado frente a los antibióticos de elección, pueden generar frustración tanto en los pacientes como en el médico tratante⁽⁷⁻⁹⁾. El objetivo de este trabajo es la revisión bibliográfica de los mecanismos de resistencias de las MCR, con énfasis en *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, por ser estas tres especies las principales patógenas en micobacteriosis en piel.

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos principalmente por tres mecanismos: alteraciones en la permeabilidad de la membrana, inactivación enzimática y modificaciones del sitio blanco⁽¹⁰⁾.

MECANISMOS DE RESISTENCIA POR ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD CELULAR

La pared celular micobacteriana es una estructura compleja compuesta por tres tipos de moléculas: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos. La

estructura de la pared otorga propiedades hidrofóbicas que ofrece baja permeabilidad, lo que se ha asociado a la resistencia intrínseca a procesos de desinfección y a los antibióticos^(11,12). La carga, el tamaño y la hidrofobicidad de los antibióticos determinan la penetración a través de la membrana celular. Las tasas de penetración de los antibióticos betalactámicos a través de la pared celular externa de *M. tuberculosis* H37Ra, es diez veces mayor que en *M. chelonae*, y 100 veces menor que en *E. coli*^(13,14). En el caso de *M. chelonae*, se han reportado estudios que demuestran que su permeabilidad a los betalactámicos y a otros antibióticos, como los aminoglicósidos, puede llegar a ser 1000 veces menor que en *E. coli*, inclusive puede llegar a ser menor que en las MNTCL⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. Existen otros elementos que en combinación con la poca permeabilidad juegan un papel importante en la resistencia tales como las porinas y las bombas de eflujo.

PORINAS Y BOMBAS DE EFLUJO EN LA MEMBRANA MICOBACTERIANA

Los antibióticos lipofílicos como los macrólidos, rifampicinas y novobiocina penetran al interior de la célula micobacteriana a través de la bicapa lipídica por difusión lenta, mientras que los antibióticos de mayor tamaño como los betalactámicos, tetraciclina, cloranfenicol y fluoroquinolonas, lo hacen mediante canales de porinas. Las porinas son proteínas integrales de membrana que funcionan como poros a través de los cuales pueden difundir las moléculas. En MCR se ha descrito la presencia de la porina MspA (*Mycobacterium smegmatis* porin A), una proteína de 184 aminoácidos que tiene una región hidrofílica y una región hidrofóbica (Figura 1). Su tamaño es de 100 kDa y está conformada por subunidades de 20 kDa que forman un poro central y ha sido involucrada en la permeabilidad de los fosfatos orgánicos e inorgánicos. En las especies del género de *Mycobacterium* se han descrito otras porinas similares denominadas MspB, MspC y MspD, sin embargo, MspA es responsable del 90% de la difusión de betalactámicos y 75% de glucosa⁽¹⁷⁻²²⁾.



Figura 1. Estructura de la porina MspA de *M. smegmatis*. La estructura secundaria principal son las hojas beta, las cuales se disponen de forma anti-paralela. Tomado de "Protein data bank" (23,24).

La densidad de porinas en la pared celular de *M. smegmatis* es 15 veces menor comparado con las bacterias Gram negativas. A través de microscopía electrónica se ha determinado que *M. smegmatis* tiene 1000 porinas/ μm^2 , a diferencia de las bacterias Gram negativas que tienen una densidad de 15000 porinas / μm^2 , aproximadamente. Este bajo número de porinas y la estructura de MspA permite que la membrana externa de *M. smegmatis* tenga baja permeabilidad a los compuestos hidrofílicos. Sumado a esto, MspA tiene un solo canal por porina, mientras que otras bacterias Gram negativas como *E. coli* tiene 3 canales por porina (23,25). La porina MspA tiene dos anillos con residuos de aspartato, cargados negativamente lo que promueve que los antibióticos betalactámicos, catiónicos e hidrofílicos crucen la membrana de la pared micobacteriana a través de esta proteína. Se ha demostrado que la disminución de esta porina se asocia al incremento

de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de ampicilina, cefaloridina, vancomicina y norfloxacina (26,27). En *M. chelonae* 9917 la porina MspA tiene una delección de 40 aminoácidos que está asociada a un incremento en la resistencia frente a los antibióticos: rifampicina, vancomicina, ciprofloxacina, claritromicina, eritromicina, linezolid y tetraciclina (28).

Otro papel que se le ha atribuido a la porina MspA es la resistencia a desinfectantes, como el glutaraldehído. Las cepas mutantes de *mspA* y *mspC* muestran resistencia a ortofaldehído (OPA) (28). La selección de aislados resistentes debido al uso de desinfectantes puede tener implicaciones importantes en el área clínica, ya que esa resistencia es compartida con varios antibióticos, algunos de ellos utilizados en la rutina para el tratamiento de infecciones ocasionadas por MCR (29).

Otras proteínas localizadas en la membrana bacteriana que se han involucrado en la resistencia a antibióticos son las bombas de eflujo, las cuales se definen como transportadores proteicos. Son sistemas de multiresistencia capaces de expulsar un amplio número de sustratos (30). Rodrigues y col. (31) describieron la presencia de una bomba de eflujo, que posteriormente se le denominó LfrA. La delección de esta bomba genera un aumento en la acumulación de bromuro de etidio (BrEt) intracelular y el incremento de la sensibilidad a la ciprofloxacina y el etambutol. Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito otras tres bombas de eflujo relacionadas a la resistencia antimicrobiana: Tap, Tet(v) y EfpA, todas pertenecientes a la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), las cuales realizan la expulsión de las sustancias a través de intercambio de protones (Tabla 1).

Tabla 1 Bombas de eflujo descritas en especies del género *Mycobacterium*

Nombre de la bomba de eflujo	Especies de micobacterias donde se ha identificado	Antibióticos que afecta	Especies con secuencias putativas con alta similitud
LfrA	<i>M. smegmatis</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium</i>	Fluoroquinolonas	<i>M. fortuitum</i>
Tap	<i>M. fortuitum</i>	Aminoglicósidos Estreptomina Gentamicina	En MCR y MNTCL con secuencias putativas de transportadores de la familia MFS
Tet(v)	<i>M. fortuitum</i> <i>M. smegmatis</i>	Tetraciclinas	Especies del complejo de <i>M. fortuitum</i>
EfpA	<i>M. smegmatis</i>	Fluoroquinolonas	En MCR y MNTCL con secuencias putativas de transportadores de la familia MFS

MFS (*Major Facilitator Superfamily*), MCR: micobacterias de crecimiento rápido, MNTCL: micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento.

La secuencia proteica de LfrA tiene un 60% de similitud con el gen *qacA* de *S. aureus* y ha sido asociada a la resistencia de fluoroquinolonas en *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* y *M. avium* ⁽³²⁾. La evaluación de la función de las bombas de eflujo dependientes de fuerza protón motriz se realiza mediante la utilización de inhibidores de protones, un ejemplo de ellos es la carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP). Liu y col. ⁽³³⁾ mediante el uso de esta molécula pudieron inhibir LfrA, obteniendo el incremento de la sensibilidad frente a norfloxacin. Se han logrado obtener cepas con alta resistencia a fluoroquinolonas mediante la sobreexpresión de la LfrA, al deletar el gen represor *IfrR* ^(34,35). Adicionalmente, se ha demostrado que esta bomba tiene mayor afinidad por la ciprofloxacina.

En *M. fortuitum* se ha descrito otra bomba de eflujo denominada Tap, perteneciente a la familia MFS. A través de ensayos utilizando inhibidores de bombas de eflujo se ha propuesto que podría relacionarse con la resistencia a una variedad de antibióticos entre ellos: aminoglicósidos, estreptomycin y gentamicina. En especies de MCR y MNTCL se pueden encontrar secuencias aminoacídicas de transportadores tipo MFS con similitudes mayor al 70% con la secuencia de Tap de *M. fortuitum* (CAA03986.1) ^(36,37).

Las tetraciclinas tienen muy buena actividad sobre las MCR, sin embargo, se ha reportado la presencia de la bomba de eflujo denominada Tet(V) en aislados resistentes de *M. fortuitum* y *M. smegmatis* ⁽³⁸⁾. El análisis de la secuencia proteica Tet(V) AAB84282.1 en BLATP disponible en NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se pueden observar alto porcentaje de homología con secuencias proteicas de *M. septicum* y *M. farcinogenes*, que son especies agrupadas dentro del complejo de *M. fortuitum* ⁽³⁹⁾. Por el contrario, en las especies *M. abscessus* y *M. chelonae* no se encuentran secuencias proteicas descritas con alta homología, por lo tanto, la Tet(V) al igual que la LfrA parece estar particularmente presente en la especies del grupo de *M. fortuitum*.

Se ha sugerido que la resistencia a fluoroquinolonas está asociada con la presencia de otra bomba de eflujo de la familia MFS: EfpA de *M. smegmatis*. De las especies de MCR se puede encontrar secuencias aminoacídicas depositadas en la base de datos de BLASTP con alta homología con EfpA de *M. smegmatis*, entre ellas *M. abscessus* y *M. fortuitum* (Tabla 2). Los aislados con mutaciones en el gen que codifica EfpA pierden la resistencia a las fluoroquinolonas ^(35,40).

Tabla 2 Comparación de la proteína EfpA de *M. smegmatis* MC2 155 (AFP39025.1) con secuencias almacenadas en BLASTP de Micobacterias no tuberculosas

Especie	% de identidad (*)	Descripción	N° de acceso
<i>M. farcinogenes</i>	90% (460/510)	Proteína de bomba de eflujo	CDP83319.1
<i>M. fortuitum</i>	90% (459/510)	Transportador MFS	WP_003880958.1
<i>M. mageritense</i>	87% (462/530)	Proteína de eflujo	CDO24434.1
<i>M. neoaurum</i>	83% (407/490)	Proteína de la familia de permeasas de salida de arabinosa	CDQ43079.1
<i>M. phlei</i>	81% (381/469)	Transportador MFS	WP_003890669.1
<i>M. thermoresistibile</i>	82% (402/491)	Transportador MFS	WP_003927154.1
<i>M. vaccae</i>	82% (394/483)	Transportador MFS	WP_003933184.1
<i>M. abscessus</i>	66% (326/493)	Transportador MFS	WP_005088277.1

(*) Número de aminoácidos que coinciden

MECANISMO DE RESISTENCIA POR INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

La inactivación enzimática es otro mecanismo descrito en las bacterias para neutralizar la acción de los antibióticos. En especies del género *Mycobacterium* se han encontrado actividades de betalactamasas, metilasas y acetiltransferasas capaces de hidrolizar e inactivar una variedad de antibióticos.

Betalactamasas

Los antibióticos betalactámicos se caracterizan por tener un anillo β -lactámico, siendo las penicilinas (penam) y las cefalosporinas (cefam) los dos subgrupos más estudiados. Los betalactámicos se unen irreversiblemente a los dominios D,D-transpeptidasas de las proteínas de unión a los betalactámicos (PBP), a través de una estructura que mimetiza el extremo C terminal del dipéptido D-Ala-D-Ala del peptidoglicano de la pared celular. Las PBP son las responsables de los puentes peptídicos intermoleculares que son necesarios para la formación del peptidoglicano ^(10,41,42).

En general las MNT son resistentes a la mayoría de los betalactámicos, con las excepciones de cefoxitina, imipenem y meropenem. La resistencia a estos antibióticos se debe principalmente a la producción de enzimas betalactamasas, que los inactivan mediante la ruptura del anillo betalactámico. En las especies del género *Mycobacterium* los genes que codifican las betalactamasas se localizan a nivel cromosómico. La mayoría de los estudios sobre las betalactamasas producidas por especies del género *Mycobacterium* están enfocados en *M. tuberculosis* (BlaC) sin embargo, las MCR presentan un mayor número de especies que producen dichas enzimas ^(16,43-48). En *M. fortuitum* y *M. smegmatis* se han descrito dos betalactamasas denominadas BlaF y BlaS, respectivamente. Al igual que las encontradas en *M. tuberculosis* tienen actividades penicilinasas, cefalosporinasas y son inducidas por la presencia de los betalactámicos ⁽⁴⁹⁻⁵³⁾. En 2014 y 2015 se caracterizó la betalactamasa BlaMab de *M. abscessus*, la cual es capaz de hidrolizar eficientemente la ceftarolina, una cefalosporina de amplio espectro que es usada para el tratamiento de infecciones en piel y tejido blando contra las bacterias con PBP de baja afinidad a los betalactámicos. La BlaMab no es inhibida

por clavulanato, sulbactam o tazobactam, por el contrario, es capaz de hidrolizarlas y se le considera como el principal determinante de resistencia para las penicilinas y cefalosporinas en *M. abscessus*. En general, BlaMab tiene una mayor actividad hidrolítica sobre los betalactámicos que BlaC de *M. tuberculosis*, con excepción de la cefoxitina ^(54,55).

Se ha demostrado que cepas con alto nivel de producción de betalactamasas y alta resistencia a penicilina son susceptibles a imipenem y a cefoxitina ⁽⁵⁶⁾. La afinidad a las PBP afectan la efectividad del betalactámico, en el caso del imipenem se ha reportado que tiene alta afinidad por las PBP de *M. fortuitum*. Se ha observado poca actividad de las cefamicinas sobre los aislados de *M. fortuitum* ⁽⁵⁷⁾.

Inhibidores de betalactamasas

Los inhibidores de las betalactamasas actúan de manera reversible o irreversible sobre esas enzimas, no tienen actividad antimicrobiana *per se* sobre las micobacterias. Los de importancia clínica son: el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam. En las últimas tres décadas se han publicado algunos estudios que evalúan la utilidad del uso de la combinación de estos inhibidores para *M. tuberculosis*, pudiendo el clavulanato inactivar la betalactamasa BlaC *in vitro* ⁽⁵⁸⁾. Algunos autores han sugerido la introducción de la amoxicilina-clavulánico dentro del esquema de tratamiento de la tuberculosis que presenta resistencia a drogas de primera línea. Sin embargo, en otros estudios han reportado poca eficacia de este inhibidor betalactámico sobre aislados de *M. tuberculosis* extremadamente resistentes, llegándose a observar 97% de resistencia. Asimismo se ha incluido ocasionalmente la combinación de clavulanato-meropenem, con buenos resultados en el tratamiento de estos casos ⁽⁵⁹⁻⁶²⁾.

En las MCR existen pocos estudios que evalúen la actividad de la combinación de betalactámicos e inhibidores de las betalactamasas. Cynamon y col. ⁽⁶³⁾ reportaron la reducción *in vitro* de la CMI de cefalotina y amoxicilina cuando se combina con el ácido clavulánico, sin embargo la actividad de estos antibióticos no fue mayor que la encontrada con la cefoxitina. El inhibidor tazobactam incrementa las actividades de amoxicilina y cefazolina para *M. fortuitum*, y cefmeta-

zole, cefoxitina y ceftizoxima para *M. abscessus* ⁽⁴⁸⁾. Recientemente Dubée y col. ⁽⁵⁴⁾ evaluaron la actividad de ceftaroline en combinación con avibactam, otro inhibidor de betalactamasa, logrando reducir la CMI en 10 aislados del grupo de *M. abscessus*. En un estudio previo, este inhibidor fue evaluado con varios betalactámicos, sin embargo la reducción de la CMI apenas se logró en dos de un total de diez antibióticos ensayados, cuando se usó el caldo MH con cationes ajustados. Sin embargo, utilizando caldo 7H9 suplementado, los autores obtuvieron una reducción en la mayoría de los antibióticos, la diferencia de resultados entre los dos medios fue asociado al uso de Tween 80 en el medio 7H9, ya que puede afectar la membrana y facilitar la acción de los antibióticos ⁽⁶⁴⁾.

Acetil-transferasas

Los aminoglicósidos son antibióticos claves en el tratamiento de infecciones ocasionadas por especies del género *Mycobacterium*. Estos antibióticos se unen de forma irreversible al sitio A del ribosoma en la subunidad mayor, generando un cambio conformacional que trae como consecuencia la lectura errónea del ARN mensajero al alterar la introducción de los aminoácidos y finalmente provocar errores en la síntesis proteica. Uno de los mecanismos de resistencia a los aminoglicósidos descrito en las especies del género *Mycobacterium* es la inactivación por la acción de acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas ⁽⁶⁵⁾.

Las MCR son productoras de enzimas acetiltransferasas cuya función es la acetilación de varios componentes importantes en los procesos celulares y metabólicos de las micobacterias. En general, en las MCR se pueden encontrar diversas enzimas con actividad acetil-transferasas y fosfotransferasas aún no estudiadas y que pueden ser importantes en la respuesta frente antibióticos que son usados frecuentemente en el tratamiento ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. En las especies micobacterianas, los genes que codifican estas enzimas tienen una localización cromosómica. Sin embargo, en el año 2014, Matsumoto y colaboradores ⁽⁶⁹⁾ hallaron un plásmido que confería resistencia a kanamicina en una cepa *M. abscessus subsp bolletii*, al que denominaron pMAB01 y que contenía genes que codificaban enzimas acetil-transferasas.

La enzima AAC (2')-Ib de *M. fortuitum* acetila de manera eficiente el grupo amino en la posición 2 de gentamicina, tobramicina, netilmicina y 6'-N-etilnetilmicina y con poca eficacia la 2'-N-etilnetilmicina y kanamicina A ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. La amikacina no es afectada por la AAC (2') por tener un grupo hidroxilo en lugar del grupo amino. Sin embargo, en otras especies bacterianas se ha descrito la presencia de AAC (6') que sí tiene la capacidad de modificar la actividad de amikacina ^(67,68). Existen otras enzimas que inactivan los aminoglicósidos mediante la fosforilación de los grupos hidroxilo, mecanismos muy bien descrito en otros grupos bacterianos. En el caso de las micobacterias, hay un reporte de una aminoglicosil-fosfotransferasa APH (3") encontrada en *M. fortuitum* que fosforila los grupos OH de la estreptomycinina afectando su actividad ⁽⁷³⁾.

Metilasas

Las metilasas son enzimas que catalizan la transferencia de uno o dos grupos metilo a los residuos adenina en la región peptidil transferasa del ARNr 23S. Esta región es importante para la interacción de los macrólidos, cuyo sitio de acción es alrededor del sitio de salida del péptido naciente y el centro de la peptidil transferasa, de esta manera bloquea la salida de la cadena peptídica (Figura 2). Adicionalmente, esta interacción interfiere otros pasos de la síntesis de proteínas como son: translocación y el bloqueo del acceso del ARNr peptidil transferasa al ribosoma ⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾.

En el género *Mycobacterium* se han descrito varias metilasas, entre ellas: Erm37, Erm38, Erm39, Erm40 y Erm41 de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. mageritense* y *M. abscessus*, respectivamente. En 2003, Nash y col ⁽⁷⁵⁾ a través de ensayos de Southern Blot, utilizando sondas de *erm38*, encontraron que ese gen estaba particularmente en *M. smegmatis* y no en otras especies del género *Mycobacterium* y que difería del *erm37*, previamente descrito en *M. tuberculosis*, por lo tanto sugerían que existía una proteína similar en *M. fortuitum* ⁽⁷⁸⁾. En un estudio posterior, Nash y col ⁽⁷⁹⁾ describieron la presencia de dicho gen en *M. fortuitum* ATCC 6841, el cual codificaba una metilasa de aproximadamente de 246 aminoácidos. Ese gen fue denominado por los autores *erm39* y fue encontrado en

aislados de *M. fortuitum* y conferirían resistencia inducible a la claritromicina.

En el año 2009, se reporta por primera vez un gen que codifica una metilasa que confiere resistencia inducible a macrólidos en *M. abscessus*: *erm41*⁽⁸⁰⁾, con una similitud alrededor del 40% con *erm38*, *erm39* y

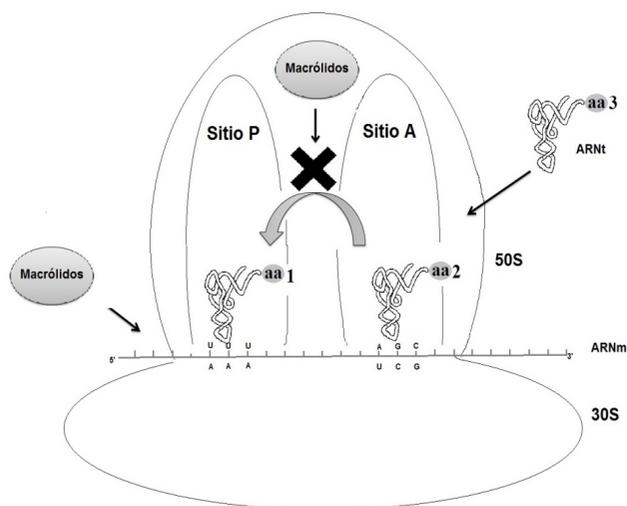


Figura 2. Mecanismos de acción de los macrólidos. Estos antibióticos se unen a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica. ARNm: ARN mensajero, ARNt: ARN de transferencia, aa: aminoácido.

69% con el gen *erm37* de *M. tuberculosis*. A través de la detección por PCR, pudieron determinar que *erm41* puede estar presente en aislados de *M. abscessus* de forma truncada, asociado a un fenotipo sensible. La delección del gen *erm41* en aislados dentro del grupo de *M. abscessus* también ha sido reportada por otros autores, e inclusive se ha propuesto como herramienta para identificar *M. mageritensis*, ya que esta es la única especie del grupo en la que se ha observado dicha delección⁽⁸¹⁾. La confirmación de este mecanismo de resistencia fue útil para explicar, en parte, las fallas terapéuticas de un porcentaje de los casos de infección causados por *M. abscessus*, considerando que la claritromicina es uno de los antibióticos principales en el esquema de tratamiento. Adicionalmente, se ha reconocido dos variantes de *M. abscessus* de acuerdo con una mutación en la posición 28 del gen *erm41*. La

variante T28 se ha observado en aislados resistentes a claritromicina y azitromicina, mientras que la variante C28 son sensibles.⁽⁸²⁾

La técnica de microdilución en caldo es usada rutinariamente para la determinación de la sensibilidad de las micobacterias, realizando la lectura final a las 72 horas, sin embargo, el fenotipo de resistencia inducible a claritromicina no se puede detectar con lecturas a los tres días de incubación con el antibiótico, por ello, varios autores han sugerido una segunda lectura a los 14 días de incubación con la claritromicina para la detección del fenotipo resistente inducible. Esta recomendación han sido incluida en la última edición del Manual de Susceptibilidad para Micobacterias de la CLSI (del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*). También se ha propuesto el análisis del gen *erm41* en aislados de *M. abscessus* para descartar genéticamente dicha resistencia^(80,83-85).

Brown-Elliott y col.⁽⁸⁶⁾ determinaron las CMI de claritromicina mediante la técnica de microdilución en caldo con lecturas a los 14 días de incubación en 199 aislados de *M. mucogenicum* y 157 de *M. immunogenum* y no encontraron fenotipos de resistencia inducible en estas dos especies. Basados en estos resultados, los autores sugieren que la búsqueda de la resistencia inducible no es necesaria en aislados identificados como *M. mucogenicum* o *M. immunogenum*. Previamente, Hansen y col.⁽⁸⁵⁾ sugirieron también prescindir de la lectura prolongada en aquellos aislados identificados como *M. chelonae*. Sin embargo, en un estudio realizado por Esteban y col.⁽⁸⁷⁾, buscaron genes codificantes de metilasas mediante la técnica de PCR usando iniciadores consenso descritos por Nash y colaboradores⁽⁷⁴⁾ y obtuvieron amplificaciones en 12 aislados de *M. chelonae*, de los cuales el 33% fueron clasificados *in vitro* como intermedios a resistentes a la claritromicina en la primera lectura incubación; los autores no incluyeron la segunda lectura de incubación para descartar fenotípicamente la resistencia inducible. Como se indica en el mismo estudio, esto pudiera deberse a diferencias locales o regionales de las cepas o que los iniciadores utilizados en la PCR son un consenso menos específico, lo que pudiera generar falsos positivos.

MECANISMOS DE RESISTENCIA DEBIDO A MODIFICACIONES DEL SITIO BLANCO

Mutaciones a nivel de ARNr16S y ARNr 23S

El ribosoma bacteriano es uno de los sitios blancos de varios grupos de antibióticos, dentro de los que cabe mencionar aminoglicósidos y macrólidos. La acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de proteínas a través de su interacción con nucleótidos del ARNr, cerca de sitios que son importantes para su función, como lo son: la región peptidil transferasa del ARNr 23S, donde se unen los macrólidos y la región ARNr 16S, sitio blanco para los aminoglicósidos. Los cambios en los sitios blancos de unión generan desde baja hasta alta resistencia a estos dos grupos de antibióticos.

La resistencia a macrólidos en micobacterias se ha asociado a mutaciones, principalmente en las posiciones 2057, 2058 y 2059 del ARNr 23S. De estas mutaciones las más importantes son aquellas que afectan el bolsillo de unión a los macrólidos, los cuales se encuentran en la posición 2058 y 2059, de acuerdo con el sistema de enumeración de *E. coli* ⁽⁸⁸⁻⁹²⁾.

La mutación de A2058G impide la formación de un puente de hidrógeno entre un grupo hidroxilo en la posición 2 del macrólido y el nitrógeno de la adenina de la posición 2058, lo que conlleva a la resistencia frente al macrólido ⁽⁷⁷⁾. Pfister y col. ⁽⁹⁰⁾, obtuvieron mediante mutagénesis dirigida, cepas de *M. smegmatis* con sustituciones simples, dobles y triples en las posiciones A2057G, A2058G y U2611C. Los autores demostraron que la mutación simple A2058G genera un patrón de resistencia a todos los macrólidos, lo cual fue similar a los aislados dobles y triples ⁽⁹³⁾. Adicionalmente, los nucleótidos A2503 y U2504 del ARNr 23S también juegan un papel importante en la resistencia de este grupo de antibióticos, ya que afectan la conformación del bolsillo de unión con la cadena lateral disacárida de los macrólidos ⁽⁹²⁾.

Wallace y col. ⁽⁸⁸⁾ realizaron el análisis mediante secuenciación de la región ARNr 23S de aislados clínicos de *M. abscessus* y *M. chelonae* obtenidos antes del inicio del tratamiento de la infección y posterior a la recaída. Los aislados previos al tratamiento mostraban sensibilidad a claritromicina y carecían de cambios en la región ARNr 23S. Sin embargo, los aislados obteni-

dos posterior al tratamiento y con recaída del paciente mostraban resistencia a claritromicina, de los cuales, el 62% presentaban un cambio en la posición 2059 y 38% en la posición 2058 del ARNr 23S, siendo la sustitución más frecuente A→G. La monoterapia de las micobacteriosis con macrólidos puede favorecer la selección de aislados con resistencia, por tal motivo se ha recomendado el tratamiento de este tipo de infección en combinación con otros antibióticos.

Además de los macrólidos, la acción de los aminoglicósidos pueden ser afectados por las mutaciones en el ARNr, como se mencionó previamente. En cepas de *M. abscessus* naturalmente resistentes a kanamicina, se han encontrado sustituciones en las posiciones A1408G, G1491T, C1409T y T1406A del ARNr 16S. Estas mutaciones proveen resistencia a otros aminoglicósidos como: amikacina, tobramicina y gentamicina. La sustitución A1408G es una de las más importantes en la adquisición de resistencia a amikacina en *M. chelonae* y *M. abscessus* ^(94,95). Los aminoglicósidos poseen entre tres y cuatro anillos, de los cuales I y II son importantes para la interacción del antibiótico con el sitio A, a través del contacto directo a los nucleótidos de la hélice 44 del ARNr 16S. El anillo I interactúa con la parte interna del bucle que está formado por A1408, A1492, A1493 y un par de bases: C1409-G1491 ^(77, 96, 97).

Al igual que los macrólidos y los aminoglicósidos, otro antibiótico, el linezolid, se une al sitio A de la subunidad 50S del ribosoma. Las mutaciones A2503G, U2504G y G2505A confieren resistencia frente a este antibiótico. La presencia de las mutaciones simples A2503G, G2505A y G2576U incrementan las CMI en dos o más diluciones. Esto también fue observado con las cepas con mutaciones dobles en las posiciones 2032, 2499, 2504, 2055 y 2572. Estas mutaciones también han sido asociadas a la resistencia a otros antibióticos como cloranfenicol y clindamicina ⁽⁹⁸⁾.

Mutaciones en genes codificantes de la ADN Girasa

Las quinolonas son antibacterianos sintéticos, de los cuales, las fluoroquinolonas se usan generalmente en el área clínica. Se caracterizan por tener un grupo fluororo en el anillo central. Dentro de este grupo, la ciprofloxacina es el antibiótico usado principalmente

para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por especies del complejo de *M. fortuitum* ^(10,99).

La quinolona se une a la subunidad A de la ADN girasa (topoisomerasa tipo II), una enzima tetramérica que actúa durante la replicación para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento del ADN, mediante cortes de doble cadena que luego son unidos por la ligasa (Figura 3). Esta proteína tiene dos subunidades: la A, que se une al ADN y la B que es una ATPasa. En la subunidad A hay un grupo de residuos

conocidos como región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR, del inglés *quinolone resistance-determining region*), en el cual se centra la interacción con estos antibióticos ⁽¹⁰⁰⁾.

Los primeros reportes proponen que la sustitución de un codón de la alanina por un codón de valina en la posición 83 de la subunidad A de la girasa de ADN puede ser parte de la causa de la resistencia a quinolonas de *E. coli*. El aminoácido en la posición 83 (serina

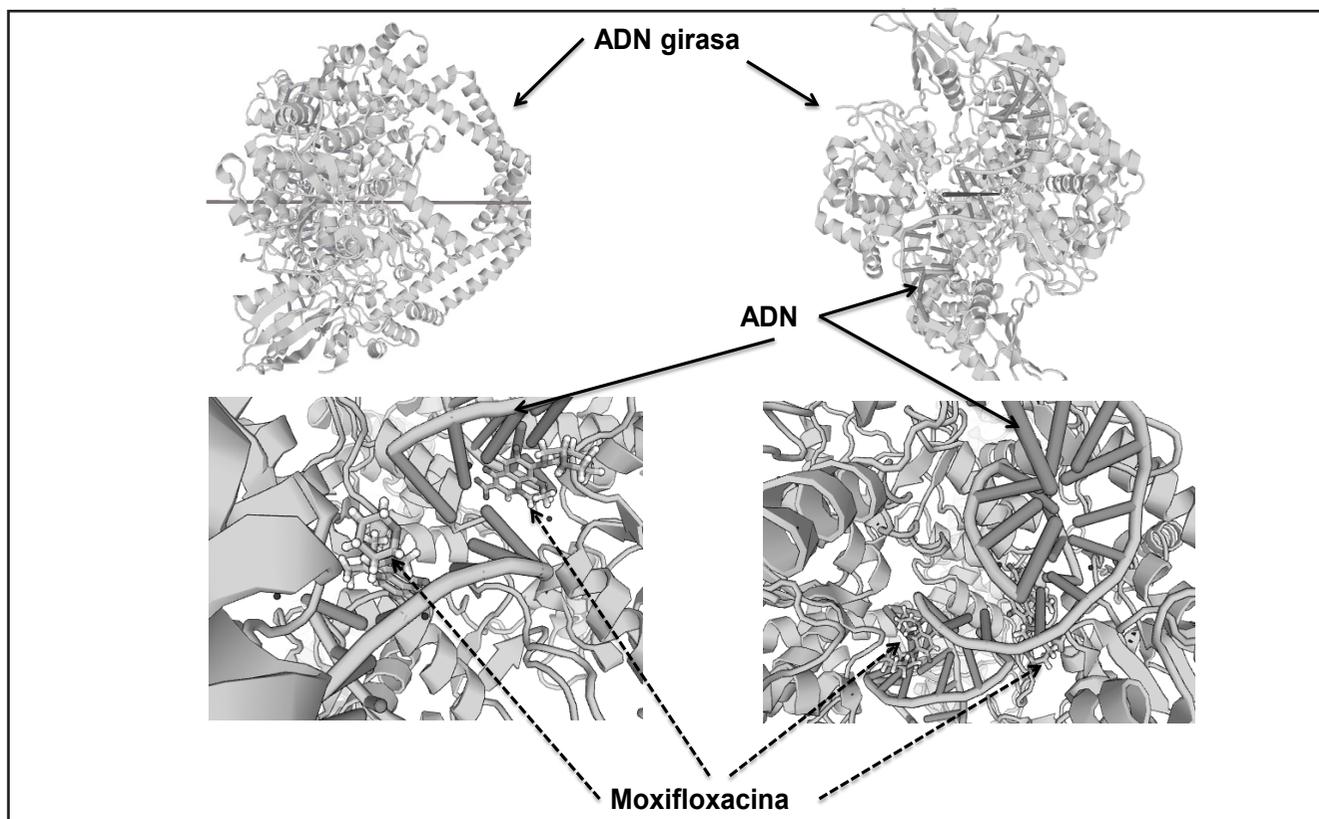


Figura 3. Interacción de la moxifloxacina con su sitio blanco de acción: la ADN girasa. Imagen tomada de Protein data bank (101).

o treonina) tiene un grupo hidroxilo que se ha propuesto como parte importante en las interacciones con las quinolonas. En el caso de *M. fortuitum*, que presenta sensibilidad intrínseca a ciprofloxacina, su ADN girasa tiene una serina en esa posición, mientras que otras especies con baja sensibilidad a este antibiótico como es

el caso de *M. chelonae*, tiene como residuo alanina ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾. En 2012, de Moura y col. ⁽¹⁰⁵⁾ analizaron mediante secuenciación los genes *gyrA* y *gyrB* de un total de 52 aislados de *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* provenientes de pacientes con infecciones posteriores a cirugías. En el estudio encontraron que la secuen-

cia peptídica contenían una alanina en la posición 83 y fenotípicamente estos aislados se caracterizaban por mostrar CMI altas a las fluoroquinolonas. En *M. massiliense* se han encontrado mutaciones que se traducen en un cambio en el codón 90 y 92 de la ADN girasa, responsables de la resistencia a fluoroquinolonas ⁽¹⁰⁶⁾.

MfPA: PROTEÍNA PENTAPÉPTIDA REPETIDA

En el género *Mycobacterium* se ha descrito otro mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas que se basa en la interacción de dos proteínas, MfpA (pentapéptido) y MfpB (GTPasa de menor tamaño) con la ADN girasa y se ha sugerido que esta interacción permite proteger a la ADN girasa de la acción de los antibióticos. MfpA (del inglés *mycobacterial fluoroquinolone resistance protein*) es una proteína dimérica de 192 aminoácidos perteneciente a la familia de los pentapéptidos repetidos, los cuales se caracterizan por tener cada cinco aminoácidos una leucina o fenilalanina y un motivo repetitivo: [S,T,A,V] [D,N] [L,F] [S,T,R] [G] ^(107,108). Aún no están claras las funciones biológicas de esa proteína pero se ha propuesto que MfpA es capaz de mimetizar el ADN-B, debido a su forma helicoidal en sentido derecho, forma dimérica, dimensiones y carga negativa, lo que promueve la competencia por la interacción con la ADN girasa (Figura 4) ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾.

Vetting y col. ⁽¹⁰⁸⁾ refieren que MfpA podría interactuar con el surco electropositivo de GyrA59 (subunidad A de la ADN girasa), lo que podría inhibir la unión al ADN y evitar la formación del complejo ADN-girasa que es finalmente el sitio blanco de acción de las fluoroquinolonas ^(109,111).

Esta proteína no ha sido descrita en MCR, por lo que se realizó la búsqueda mediante el análisis de alineamiento de la secuencia proteica de MfpA de *M. tuberculosis* (gi: 71042655) usando el programa blastp (BLAST), con la intención de conocer posibles secuencias con identidad a estos pentapéptidos y se pudieron encontrar secuencias reportadas con alto porcentaje de similitud (70 a 80%) con la secuencia proteica de MfpA de *M. tuberculosis* en especies de MCR como *M. fortuitum* y *M. chelonae*. Esto también puede observarse en especies de MNTCL, entre ellas *M. kansasii*, *M. avium* y *M. intracellulare*.

A pesar que en la última década se ha incrementado el interés de las MCR, sobre todo en *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, aún son necesarios estudios que aborden la problemática de la resistencia antimicrobiana de estas especies. El descubrimiento de las metilasas en los aislados de *M. abscessus* es un claro ejemplo de la importancia de estudios que expliquen

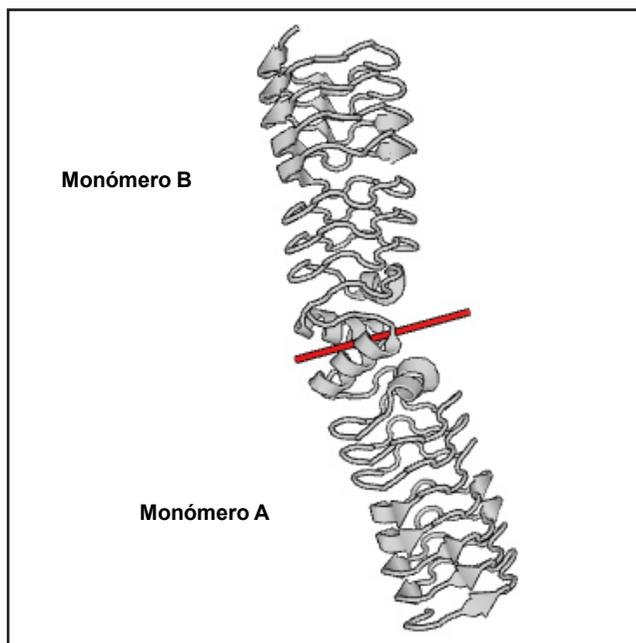


Figura 4. Representación del dímero MfpA de *M. tuberculosis*. Imagen tomada de Protein data bank (112).

las causas que conllevan a las fallas terapéuticas. En la Figura 5, se muestra un resumen de los mecanismos de resistencia descritos en las tres especies de Micobacterias de crecimiento rápido de mayor interés.

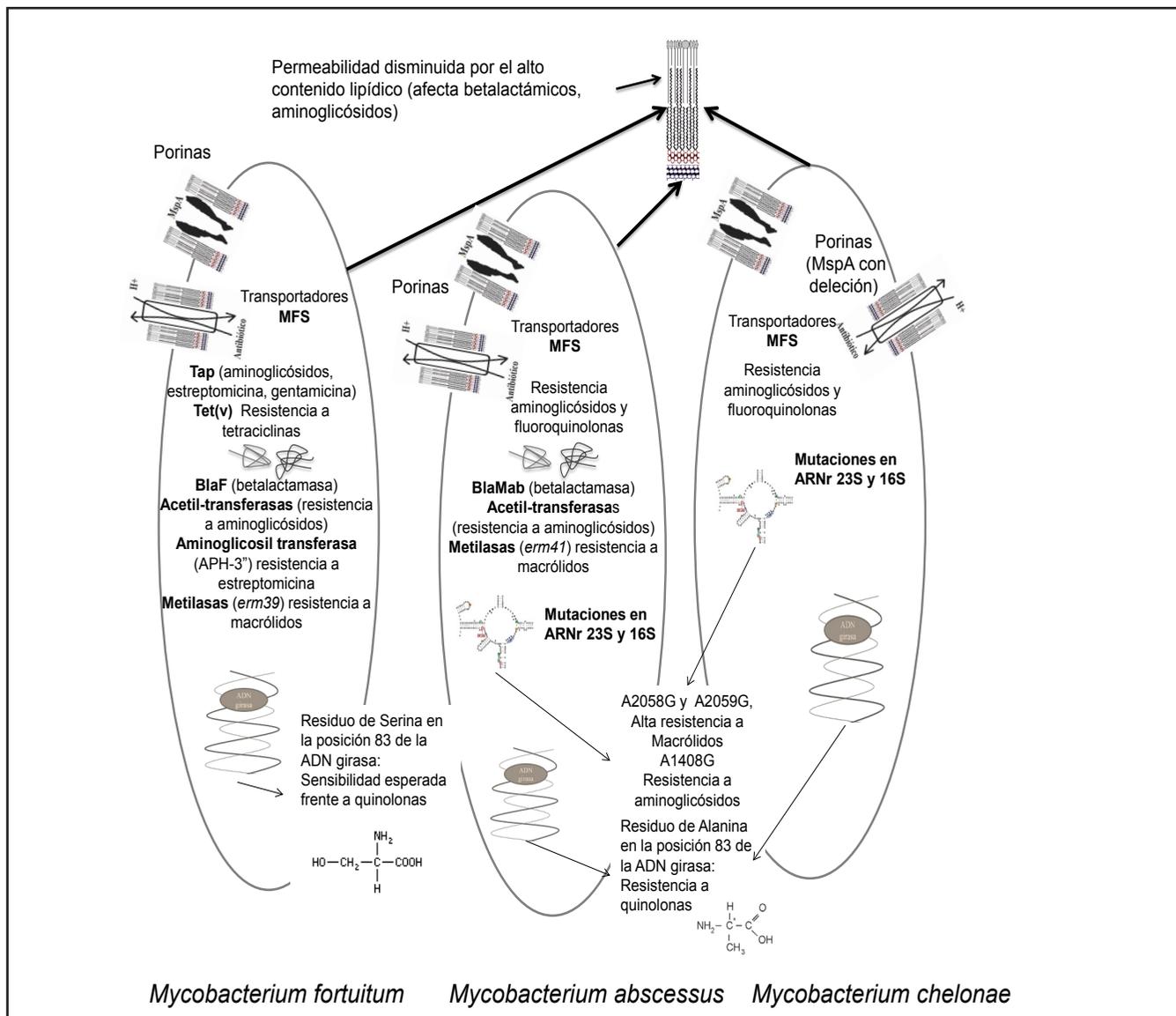


Figura 5. Representación gráfica de los mecanismos de resistencias descritos en *Mycobacterium fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. MFS: "Major Facilitator Superfamily".

REFERENCIAS:

- Kim O, Cho Y, Lee K, Yoon S, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012; 62(3): 716-21.
- Da Mata-Jardín O, Hernández-Pérez R, Corrales H, Cardoso-Leao S, de Waard J. Follow-up of an outbreak

- of *Mycobacterium abscessus* soft-tissue infection associated with mesotherapy in Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(9): 596-01.
- Rivera-Olivero I, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Perez-Alfonzo R, Piquero J, et al. Infecciones en tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia ¿cuánto vale la belleza? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24(5): 302-6.

4. Murillo J, Torres J, Bofill L, Ríos-Fabra A, Irausquin E, Istúriz R, et al. Skin and wound infection by rapidly growing Mycobacteria. Arch Dermatol. 2000; 136: 1347-52.
5. Timpe A, Runyon E. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. J Lab Clin Med. 1954: 202-209.
6. Griffith D, Aksamit T, Brown-Elliot B, 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(4): 67-416.
7. De Groote M, Gibbs S, de Moura V, Burgess W, Richardson K, Kasperbauer S, et al. Analysis of a panel of rapidly growing mycobacteria for resistance to aldehyde-based disinfectants. Am J Infect Control. 2014; 42(8): 932-4.
8. Fisher C, Fiorello A, Shaffer D, Jackson M, McDonnell G. Aldehyde-resistant mycobacteria associated with the use of endoscope reprocessing systems. Am J Infect Control. 2012; 40(9): 880-2.
9. Cortesia C, Lopez G, de Waard J, Takiff H. The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(12): 2574-81.
10. Joklik W, Willett H, Amos B, Wilfert C. Zinsser Microbiología. 20th ed. Buenos aires: Panamericana; 1997.
11. Kieser K, Rubin E. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. Nat Rev Microbiol. 2014; 12(8): 550-62.
12. Crellin P, Luo C, Morita Y. Metabolism of Plasma Membrane Lipids in Mycobacteria and Corynebacteria. 2013. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/metabolism-of-plasma-membrane-lipids-in-mycobacteria-and-corynebacteria> (Consultado 21 de Octubre del 2014).
13. Chambers H, Moreau D, Yajko D, Miick C, Wagner C, Hackbarth C, et al. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(12): 2620-4.
14. Jarlier V, Gutmann L, Nikaido H. Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(9): 1937-9.
15. Jarlier V, Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. J Bacteriol. 1990; 172(3): 1418-23.
16. Flores A, Parsons L, Pavelka M. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. Microbiology. 2005; 151(2): 521-32.
17. Stahl C, Kubetzko S, Kaps I, Seeber S, Engelhardt H, Niederweis M. MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol. 2001; 40(2): 451-64.
18. Heinz C, Engelhardt H, Niederweis M. The core of the tetrameric mycobacterial porin MspA is an extremely stable beta-sheet domain. J Biol Chem. 2003; 278(10): 8678-85.
19. Wolschendorf F, Mahfoud M, Niederweis M. Porins are required for uptake of phosphates by *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. 2007; 189(6): 2435-42.
20. Purdy G, Niederweis M, Russell D. Decreased outer membrane permeability protects mycobacteria from killing by ubiquitin-derived peptides. Mol Microbiol. 2009; 73(5): 844-57.
21. Niederweis M, Ehrh S, Heinz C, Klöcker U, Karosi S, Swiderek K, et al. Cloning of the *mspA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol. 1999; 33(5): 933-45.
22. Mailaender C, Reiling N, Engelhardt H, Bossmann S, Ehlers S, Niederweis M. The MspA porin promotes growth and increase antibiotics susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 2004; 150(4): 853-64.
23. Faller M, Niederweis M, Schulz G. The structure of mycobacterial outer-membrane channel. Science. 2004; 303(5661): 1189-92.
24. Berman H, Wetsbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. 2000; 28(1): 235-42.
25. Engelhardt H, Heinz C, Niederweis M. A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. J Biol Chem. 2002; 277(40): 37567-72.
26. Stephan J, Mailaender C, Etienne G, Daffé M, Niederweis M. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(11): 4163-70.
27. Danilchanka O, Pavlenok M, Niederweis M. Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smeg-*

- matris*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(9): 3127-34.
28. Svetlíková Z, Skovierová H, Niederweis M, Gaillard J, McDonnell G, Jackson M. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(9): 4015-8.
29. Cortesia C, Lopez G, de Waard J, Takiff H. The use of the quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. J Antimicrob Chemother. 2010; 65 (12): 2574-81.
30. Sánchez-Díaz P. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. Rev Esp Quimioterap. 2003; 16(2): 172-187.
31. Rodrigues L, Ramos J, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell wall: correlation with antibiotic resistance. BMC Microbiol. 2011; 11(35).
32. Takiff H, M C, Musso M, Weisbrod T, Martinez R, Delgado M, et al. Efflux pump of the proton antiporter family confers low level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(1): 362-6.
33. Liu J, Takiff H, Nikaido H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. J Bacteriol. 1996; 178(13): 3791-5.
34. De Rossi E, Aínsa J, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiol Rev. 2006; 30(1): 36-52.
35. Li X, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(7): 2415-23.
36. Aínsa J, Blokpoel M, Otal I, Young D, De Smet K, Martín C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1998; 180(22): 5836-43.
37. Ramón-García S, Martín C, Aínsa J, De Rossi E. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(2): 252-9.
38. De Rossi E, Blokpoel M, Cantoni R, Branzoni M, Riccardi G, Young D, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(8): 1931-7.
39. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (Consultado 20 de Noviembre del 2010).
40. Mishra M, Daniels L. Characterization of the MS-MEG_2631 gene (*mmp*) encoding a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family protein in *Mycobacterium smegmatis* and exploration of its polyspecific nature using biologic phenotype microarray. J Bacteriol. 2013; 195(7): 1610-21.
41. Suárez C, Gudíol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27(2): 116-129.
42. Rivas K, Rivas M, Dávila E, Rodríguez M. Cefalosporinas: De la primera a la cuarta generación. RFM. 2002; 25(2): 142-153.
43. Hall B, Barlow M. Structure-based phylogenies of the serine beta-lactamases. 2003; 57(3): 255-60.
44. Segura C, Salvadó M, Collado I, Chaves J, Coira A. Contribution of beta-lactamases to beta-lactam susceptibilities of susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(6): 1524-6.
45. Fattorini L, Scardaci G, Jin S, Amicosante G, Franceschini N, Oratore A, et al. Beta-lactamase of *Mycobacterium fortuitum*: kinetics of production and relationship with resistance to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(9): 1760-4.
46. Kasik J, Peacham L. Properties of beta-lactamases produced by three species of mycobacteria. 1968; 107(5): 675-82.
47. Amicosante G, Maccarrone M, Franceschini N, Oliva B, Segatore B, Oratore A. On the kinetic interaction between ceftriaxone and some beta-lactamases. Drug Exp Clin Res. 1988; 14(1): 25-30.
48. Kwon H, Tomioka H, Saito H. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. Tuberc Lung Dis. 1995; 76(2): 141-8.
49. Sauvage E, Fonze E, Quinting B, Galleni M, Frere J, Charlier P. Crystal structure of the *Mycobacterium fortuitum* class A beta-lactamase: structural basis for broad substrate specificity. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(7).
50. Quinting B, Galleni M, Tim J, Gicquel B, Amicosante G, Frere J. Purification and properties of the *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155 beta-lactamase. FEMS. 1997; 149(1):11-5.

51. Amicosante G, Franceschini N, Segatore B, Oratore A, Fattorini L, Orefici G, et al. Characterization of a beta-lactamase produced in *Mycobacterium fortuitum* D316. *Biochem J.* 1990; 271(3): 729-34.
52. Nash D, Wallace R, Steingrube V, Udou TSL, Forrester G. Characterization of beta-lactamases in *Mycobacterium fortuitum* including a role in beta-lactam resistance and evidence of partial inducibility. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134(6): 1276-82.
53. Fattorini L, Oliva B, Orefici G. Expression and some properties of beta-lactamases from *Mycobacterium fortuitum*. *Drugs Exp Clin Res.* 1986; 12(12): 973-7.
54. Dubée V, Soroka D, Cortes M, Lefebvre A, Gutmann L, Hugonnet J, et al. Impact of beta-lactamase inhibition on the activity of ceftraxone against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(5): 2938-41.
55. Soroka D, Dubée V, Soulier-Escrihuela O, Cuinet G, Hugonnet J, Gutmann L, et al. Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(3): 691-6.
56. Fattorini L, Orefici G, Jin S, Scardaci G, Amicosante G, Franceschini N, et al. Resistance to beta-lactams in *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(5): 1068-72.
57. Cynamon M, Palmer G. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* to N-formimidoyl thienamycin and several cephamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 22(6): 1079-81.
58. Hugonnet J, Blanchard J. Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase by clavulanate. *Biochemistry.* 2007; 46(43): 11998-2004.
59. Donald P, Sirgel F, Venter A, Parkin D, Van de Wal B, Barendse A, et al. Early bactericidal activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid in patients with sputum smear-positive pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis.* 2001; 33(6): 466-9.
60. Ahmed I, Jabeen K, Inayat R, Hasan R. Susceptibility testing of extensively drug-resistance and pre-extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* against levofloxacin, linezolid and amoxicillin-clavulanate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(6): 2522-5.
61. Dauby N, Muylle I, Mouchet F, Sergysels R, Payen M. Meropenem/clavulanate and linezolid treatment for extensively drug-resistant tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(9): 812-3.
62. Payen M, De Wit S, Martin C, Sergysels R, Muylle I, Van Laethem Y, et al. Clinical use of the meropenem-clavulanate combination for extensively drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012; 16(4): 558-60.
63. Cynamon M, Palmer G. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* to amoxicillin or cephalothin in combination with clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 23(6): 935-7.
64. Dubée V, Bernut A, Cortes M, Lesne T, Dorchene D, Lefebvre A, et al. Beta-lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70(4): 1051-8.
65. Mella M S, Sepúlveda A M, González R G, Bello T H, Domínguez Y M, Zemelman Z R, et al. Aminoglicósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infect.* 2004; 21(4): 330-338.
66. Hull S, Wallace RJ, Bodey D, Price K, Goodhines R, Swenson J, et al. Presence of aminoglycoside acetyltransferase and plasmids in *Mycobacterium fortuitum*. Lack correlation with intrinsic aminoglycoside resistance. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129(4): 614-8.
67. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G, Macielag M, Abbanat D, Park C, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006; 12(1): 83-8.
68. Maurer F, Bruderer V, Ritter C, Castelberg C, Bloemberg G, Böttger E. Lack of antimicrobial bactericidal activity in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(7): 3828-36.
69. Matsumoto C, Bispo P, Santin K, Nogueira C, Leão S. Demonstration of plasmid-mediated drug resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(5): 1727-9.
70. Aínsa J, Martin C, Gicquel B, Gomez-Lus R. Characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase gene from *Mycobacterium fortuitum* antimicrob. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(10): 2350-5.
71. Aínsa J, Pérez E, Pelicic V, Berthet F, 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(2): 431-41.
72. Green K, Chen W, Houghton J, Fridman M, Garneau-Tsodikova S. Exploring the substrate promiscuity of drug-modifying enzymes for the chemoenzymatic generation of N-acetylated aminoglycosides. *Chembiochem.* 2010; 11(1): 119-26.

73. Ramón-García S, Otal I, Martín C, Gómez-Lus R, Ainsa J. Novel streptomycin resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(11): 3920-2.
74. Nash K, Andini N, Zhang Y, Brown-Elliott B, Wallace RJ. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(10): 3476-8.
75. Nash K. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel erm gene, *erm(38)*. Agents Chemother. 2003; 47(10): 3053-60.
76. Böttger E, Springer B, Prammananan T, Kidan Y, Sander P. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. EMBO Rep. 2001; 2(4): 318-23.
77. Akshay S, Berteza M, Hobbie S, Oettinghaus B, Shcherbakov D, Böttger E, et al. Phylogenetic sequence variations in bacterial rRNA affect species-specific susceptibility to drugs targeting protein synthesis. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(9): 4096-102.
78. Madsen C, Jakobsen L, Douthwaite S. *Mycobacterium smegmatis erm(38)* is a reluctant dimethyltransferase. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(9): 3803-9.
79. Nash K, Zhang Y, Brown-Elliott B, Wallace RJ. Molecular basis of intrinsic macrolid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(2): 170-7.
80. Nash K, Brown-Elliott B, 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(4): 1367-76.
81. Kim H, Kim B, Kook Y, Yun Y, Shin J, Kim B, 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(6): 347-53.
82. Bastian S, Veziris N, Roux A, Brossier F, Gaillard J, Jarlier V, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm(41)* and *rpl* sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(2): 775-81.
83. CLSI. Susceptibility testing of *Mycobacterium*, *Nocardiae* and other aerobic *Actinomycetes*. CLSI document M24-A2. 2011.
84. Brown B, Wallace RJ, Onyi G, De Rosas V, Wallace R3. Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *M. chelonae-like organisms*. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(1): 180-4.
85. Hanson K, Slechta E, Muir H, Barker A. Rapid molecular detection of inducible macrolide resistance in *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus* strains: a replacement for 14 day susceptibility testing? J Clin Microbiol. 2014; 52(5): 1705-7.
86. Brown Elliott B, Hanson K, Vasireddy S, Iakhiaeva E, Nash K, Vasireddy R, et al. The absence of a functional *erm* Gene in isolates of *Mycobacterium immunogenum* and the *Mycobacterium mucogenicum* group based on *In Vitro* Clarithromycin susceptibility. J Clin Microbiol. 2015; 53(3): 875-8.
87. Esteban J, Martín-de-Hijas N, García-Almeida D, Bodas-Sánchez A, Gadea I, Fernández-Roblas R. Prevalence of *erm* methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Infect. 2009; 15(10): 919-23.
88. Wallace RJ, Meier A, Brown B, Zhang Y, Sander P, Onyi G, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(7): 1676-81.
89. Nash K, Inderlied C. Genetic basis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* isolated from patients with disseminated disease. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(12): 2625-30.
90. Pfister P, Corti N, Hobbie S, Bruell C, Zarivach R, Yonath A, et al. 23S rRNA base pair 2057-2011 determines ketolides susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A-G. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(14): 5180-5.
91. Douthwaite S, Aagaard C. Erythromycin binding is reduced in ribosomes with conformational alterations in the 23S rRNA peptidyl transferase loop. J Mol Biol. 1993; 232(3): 725-31.
92. Li B, Wu C, Wang Y, Shen J. Single and dual mutations at positions 2058, 2503 and 2504 of 23S rRNA and their relationship to resistance to antibiotics that target the large ribosomal subunit. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(9): 1983-6.
93. Poehlsgaard J, Pfister P, Böttger E, Douthwaite S. Molecular mechanisms by which rRNA mutations confer resistance to clindamycin. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(4): 1553-5.
94. Nessar R, Reytrat J, Murray A, Gicquel B. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(8): 1719-24.

95. Prammananan T, Sander P, Brown B, Frischkorn K, Onyi G, Zhang Y, 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(6): 1573-81.
96. Pfister P, Hobbie S, Brüll C, Corti N, Vasella A, Westhof E, et al. Mutagenesis of 16S rRNA C1409-G1491 base pair differentiates between 6'OH and 6' NH₃⁺ aminoglycosides. J Mol Biol. 2005; 346(2): 467-75.
97. Kalapala S, Hobbie S, Böttger E, Shcherbakov D. Mutation K42R in ribosomal protein S12 does not affect susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* 16S rRNA A-site mutants to 2-deoxystreptamines. Plos One. 2010; 5(8): e11960.
98. Long K, Munck C, Andersen T, Schaub M, Hobbie S, Böttger E, 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(11): 4705-13.
99. Cheng D, Xu W, Liu C. Relationship of quantitative structure and pharmacokinetics in fluoroquinolone antibacterials. World J Gastroenterol. 2007; 13(17): 2496-503.
100. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34(6): 1271-2.
101. Blower T, Williamson B, Kerns R, Beger J. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2016; 13(7): 1706-13.
102. Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the *gyrA* gene of mycobacteria. FEMS Microbiol Lett. 1994; 116(1): 49-54.
103. Guillemin I, Cambau E, Jarlier V. Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(9): 2145-9.
104. Revel V, Cambau E, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of mutations in *Mycobacterium smegmatis* involved in resistance to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(9): 1991-6.
105. De Moura V, da Silva M, Gomes K, Coelho F, Sampaio J, Mello F, et al. Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* recovered from postsurgical infections. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 1): 115-25.
106. Lee S, Yoo H, Kim S, Koh W, Kim C, Park Y, et al. The drug resistance profile of *Mycobacterium abscessus* group strains from Korea. Ann Lab Med. 2014; 34(1): 31-7.
107. Hegde S, Vetting M, Roderick S, Mitchenall L, Maxwell A, Takiff H, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science. 2005; 308(5727): 1480-3.
108. Vetting M, Hedge S, Fajardo J, Fiser A, Roderick S, Takiff H, et al. Pentapeptide repeat proteins. Biochemistry. 2006; 45(1): 1-10.
109. Hedge S, Vetting M, Mitchenall L, Maxwell A, Blancard J. Structural and biochemical analysis of the pentapeptide repeat protein EfsQnr, a potent DNA gyrase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(1): 110-7.
110. Mérens A, Matrat S, Aubry A, Lascols C, Jarlier V, Soussy C, et al. The pentapeptide repeat proteins MfpAMt and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex. J Bacteriol. 2009; 191(5): 1587-94.
111. Tao J, Han J, Wu H, Hu X, Deng J, Fleming J, et al. *Mycobacterium* fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. Nucleic Acids Res. 2013; 41(4): 2370-81.
112. Hedge S, Vetting M, Roderick S, Mitchenall L, Maxwell A, Takiff H, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science. 2005; 308(5727): 1480-3.