

## Sensibilidad a los antimicrobianos de micobacterias de crecimiento rápido mediante el método E-test

Lidia García-Agudo<sup>1</sup>, Pedro García-Martos<sup>2</sup>, Iría Jesús<sup>1</sup>, Manuel Rodríguez-Iglesias<sup>1</sup>.

### *Assessment of in vitro susceptibility to antimicrobials of rapidly growing mycobacteria by E-test*

**Background:** Rapidly growing mycobacteria (RGM) are considered opportunistic pathogens. An increasing number of post traumatic or surgical infections are caused by these microorganisms. **Aim:** To determine the antimicrobial susceptibility of RGM using the E-test method. **Material and methods:** A total of 54 isolates of RGM was obtained from several clinical samples and selected for this study. Strains were identified to the species level by phenotypic and biochemical characteristics, PCR-restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene (PRA) and sequencing of the 16S rRNA. Susceptibility was investigated by E-test to amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, imipenem, quinupristin/dalfopristin, linezolid and tigecycline. **Results:** Twelve different species of RGM were identified: *Mycobacterium fortuitum* (23 strains), *M chelonae* (11), *M abscessus* (10), *M senegalense* (2), *M alvei* (1), *M brumae* (1), *M mageritense* (1), *Mucogenicum* (1), *M neoaurum* (1), *M peregrinum* (1), *M septicum* (1) y *M smegmatis* (1). All the strains were inhibited by low concentrations of amikacin and tigecycline. Susceptibility to cefoxitin, fluoroquinolones, clarithromycin, imipenem and linezolid was variable. All but two strains were resistant to quinupristin/dalfopristin. **Conclusions:** Due to the uneven antimicrobial susceptibility of different species of RGM, an antimicrobial susceptibility test is mandatory for these microorganisms. The E-test method is well suited to determine minimum inhibitory concentrations (MIC) (Rev Méd Chile 2009; 137: 912-7). **(Key words:** Anti-bacterial agents; Drug resistance, bacterial; Mycobacteriaceae)

Recibido el 26 de enero, 2009. Aceptado el 26 de mayo, 2009.

<sup>1</sup>Hospital Universitario de Puerto Real. Cádiz, España. <sup>2</sup>Hospital Universitario Puerto del Mar. Cádiz, España.

Las micobacterias de crecimiento rápido (MCR) se consideran patógenas oportunistas. Durante las tres últimas décadas se ha producido un notable incremento de la infecciones postraumáticas y postquirúrgicas debidas a estos microorganismos, y en los últimos años se han asociado con frecuencia a infecciones localizadas y disemina-

das, incluyendo brotes de infección por contaminación de equipos médicos<sup>1-9</sup>.

Las MCR predominantes en infecciones humanas son las especies que conforman actualmente los grupos *Mycobacterium fortuitum*, *M chelonae* y *M abscessus*; el resto de especies son minoritarias y solamente se refieren en infecciones ocasionales. La descripción de nuevas especies relacionadas con infecciones nosocomiales e infecciones graves en pacientes con neoplasias e inmunocomprometidos, ha sido posible gracias al desarrollo de modernos sistemas de diagnóstico microbiológico<sup>10,11</sup>.

Correspondencia a: Lidia García-Agudo. C/ Ana de Viya, 13-2B. 11009 Cádiz (España). E mail: lidiagarciaagudo@gmail.com  
Pedro García-Martos. C/ Ana de Viya, 13-2B. 11009 Cádiz (España). Fax: +34956003081. E mail: pedromartos@hotmail.com

El tratamiento de las infecciones causadas por MCR es distinto al del resto de micobacterias, debido a la diferente sensibilidad *in vitro* de estos microorganismos, que son resistentes a los tuberculostáticos convencionales. Como la sensibilidad de estas micobacterias a los antimicrobianos no es uniforme, se recomienda realizar el antibiograma a cada cepa, puesto que los resultados pueden tener considerable trascendencia para el tratamiento. Los estudios de series con gran número de cepas permiten orientar una terapia empírica mediante el conocimiento global de la sensibilidad de las distintas especies en determinadas áreas geográficas<sup>12</sup>.

En la actualidad la técnica de microdilución en caldo es la aconsejada para determinar la sensibilidad de las MCR, siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A pesar de la utilidad de esta técnica, uno de sus inconvenientes es la dificultad de realizarla en la mayoría de laboratorios asistenciales; la relativa lentitud de los laboratorios de referencia puede ser un inconveniente a la hora de tratar pacientes con enfermedades graves. Es necesario, pues, disponer de un método más accesible para un primer estudio. En los últimos años se ha introducido la técnica comercial E-test, que ha resultado rentable para este propósito, aunque los resultados deberían confirmarse por la técnica de referencia. El empleo de otras técnicas como la de difusión en agar con discos no es recomendable, pues estas técnicas no están bien estandarizadas y los resultados obtenidos no se correlacionan adecuadamente con los de la técnica de referencia<sup>13-15</sup>.

Con el fin de conocer la sensibilidad a los antimicrobianos de uso habitual de las diferentes especies de MCR aisladas en nuestra área sanitaria, determinamos mediante el método E-test la actividad de nueve antimicrobianos frente a 54 cepas aisladas de dos hospitales de la Bahía de Cádiz.

#### MATERIAL Y MÉTODO

Las 54 cepas utilizadas en este estudio procedían de pacientes atendidos en las consultas externas y de hospitalización del Hospital Universitario de Puerto Real y del Hospital Universitario Puerta del Mar, ambos en Cádiz (España), durante los años 2000 y 2006.

Estas micobacterias se aislaron tras cultivo en medio sólido de Löwenstein-Jensen y en medio líquido Middlebrook 7H9 procesado en el sistema

automatizado Bactec MGIT 960 (Becton-Dickinson, Reino Unido).

La identificación de las cepas se realizó mediante técnicas fenotípicas (temperatura de crecimiento, velocidad de crecimiento en medio sólido y formación de pigmento), técnicas bioquímicas (reducción de nitratos, producción de arilsulfatasa y ureasa, hidrólisis del tween 80, crecimiento en presencia de CINA al 5% y en agar de Mac Conkey sin cristal violeta y utilización de manitol, inositol y sorbitol), y el método molecular INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Bélgica). Posteriormente, se confirmó la identidad de las cepas por técnicas genéticas de biología molecular (análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA) y secuenciación del gen 16S ARN ribosómico) realizadas en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España).

El estudio de sensibilidad a antimicrobianos se efectuó empleando la técnica comercial E-test (AB Biodisk, Suecia). Los antimicrobianos ensayados fueron nueve en total: seis de uso en el tratamiento de micobacteriosis (amikacina, cefoxitina, ciprofloxacino, levofloxacino, claritromicina e imipenem), y otros tres de reciente aparición en el mercado, de los cuales aún no se tiene suficiente experiencia sobre su eficacia en el tratamiento de estas infecciones (linezolid, quinupristina/dalfopristina y tigeciclina).

La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El inóculo bacteriano se confeccionó a partir de las colonias crecidas en medio de Löwenstein-Jensen, homogeneizadas en tampón fosfato a pH 7,0 hasta alcanzar una turbidez igual al punto 1,0 de la escala de Mac Farland, correspondiente aproximadamente a  $10^9$  UFC/ml. Esta suspensión bacteriana fue inoculada con escobillón en la superficie de placas de 140 mm de diámetro conteniendo agar de Mueller-Hinton. Las tiras de E-test se colocaron sobre la superficie del medio con una ventosa, y las placas se incubaron a 35°C-37°C hasta observar crecimiento aparente (72 h de media). Después de la incubación se anotó la CMI correspondiente al punto donde el área de inhibición del crecimiento intersecciona con la tira.

Los criterios de interpretación de las cepas como sensibles o resistentes fueron los recomendados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), en el documento M24-A de 2003, y por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) en el caso de la

tigeciclina (Tabla 1). Como cepa control se utilizó *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841<sup>16,17</sup>.

RESULTADOS

Durante los años 2000 y 2006 se aislaron 54 MCR procedentes de diversas muestras clínicas: 34 secreciones respiratorias, 9 abscesos cutáneos, 4 orinas, 4 úlceras corneales, 1 nódulo linfático, 1 líquido peritoneal y 1 sangre. Los aislamientos procedían de 35 hombres (64,8%) y 19 mujeres (35,2%), de edades comprendidas entre 13 y 69 años (edad media 44,8 años). Los pacientes eran ambulatorios en su mayoría (81,5%) y solamente 10 de ellos estaban hospitalizados.

Las cepas fueron identificadas mediante técnicas de biología molecular como pertenecientes a 12 especies diferentes: *Mycobacterium fortuitum* (23 cepas), *M chelonae* (11), *M abscessus* (10), *M senegalense* (2), *M alvei* (1), *M brumae* (1), *M mageritense* (1), *M mucogenicum* (1), *M neoaurum* (1), *M peregrinum* (1), *M septicum* (1) y *M smegmatis* (1).

El comportamiento de las 12 especies de MCR frente a los nueve antimicrobianos ensayados fue desigual. En la Tabla 2 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y los porcentajes de sensibilidad de las especies más frecuentes en clínica; en la Tabla 3 se reflejan las CMI de las especies minoritarias.

La sensibilidad de *M fortuitum*, *M chelonae* y *M abscessus* frente a amikacina y tigeciclina fue de 100%. Frente a cefoxitina, los porcentajes de resistencia fueron elevados para *M chelonae* (27% de cepas sensibles) y *M abscessus* (10% de cepas sensibles), mientras que para *M fortuitum* la sensi-

bilidad fue de 74%. Ciprofloxacino y levofloxacino mostraron buena actividad frente a *M fortuitum*, próxima a 90%, pero muy baja frente a *M chelonae* (18%) y *M abscessus* (10%). Claritromicina fue efectiva para 75% de las cepas de *M fortuitum* y 80% de las cepas de *M abscessus*; en el caso de *M chelonae*, solamente 54% de las cepas fue sensible. La sensibilidad frente a imipenem fue elevada para *M fortuitum* (83%), baja para *M abscessus* (40%) y muy baja para *M chelonae* (18%). La actividad de linezolid fue intermedia en el caso de *M fortuitum* y *M chelonae* (61% y 60%, respectivamente), pero alta en *M abscessus* (91%). Quinupristina/dalfopristina presentó una actividad inferior a 50% para las tres especies.

El resto de las especies fueron sensibles en su totalidad a amikacina y tigeciclina. Se detectó resistencia frente a cefoxitina en *M smegmatis* (sensibilidad intermedia); frente a quinolonas en *M brumae* y *M mucogenicum* (resistentes a ciprofloxacino y sensibles a levofloxacino); frente a claritromicina en *M alvei*, *M brumae* (sensibilidad intermedia) y *M smegmatis*; frente a imipenem en *M smegmatis* (sensibilidad intermedia); y frente a linezolid en *M alvei* (sensibilidad intermedia). En el caso de quinupristina/dalfopristina, todas las especies fueron resistentes, excepto *M alvei* y *M peregrinum*.

DISCUSIÓN

Las MCR se encuentran con preferencia en el ambiente, pero son relativamente poco habituales en clínica. Las especies predominantes en clínica son tres: *Mycobacterium fortuitum*, *M chelonae* y *M abscessus*; el resto de las especies se aíslan ocasionalmente. La mayoría de las especies pertenecen al grupo de las

Tabla 1. Criterios de interpretación de la sensibilidad de micobacterias de crecimiento rápido a los antimicrobianos ensayados (CMI en mg/L)

Antimicrobiano	Sensibilidad	Sensibilidad intermedia	Resistencia
Amikacina	≤ 16	32	≥ 64
Cefoxitina	≤ 16	32-64	≥ 128
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacino	≤ 2	4	≥ 8
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
Quinupristina/dalfopristina	≤ 1	2	≥ 4
Tigeciclina	≤ 1	-	≥ 2

**Tabla 2. Actividad *in vitro* de 9 antimicrobianos frente a cepas de micobacterias de crecimiento rápido (CMI expresada en mg/L)**

Especie (cepas)	Rango	CMI50	CMI90	Sensibilidad %
<i>M. fortuitum</i> (23)				
Amikacina	0,023 - 2	0,75	1,5	100
Cefoxitina	1,5 - 24	12	24	74
Ciprofloxacino	0,016 - 2	0,064	1	87
Levofloxacino	0,012 - 2	0,032	1	91
Claritromicina	≤0,016 - 8	0,5	6	78
Imipenem	0,094 - ≥32	1,5	≥32	83
Linezolid	0,25 - ≥64	8	64	61
Quinupristina/dalfopristina	0,38 - ≥32	≥32	≥32	22
Tigeciclina	≤0,016 - 0,032	0,016	0,032	100
<i>M. chelonae</i> (11)				
Amikacina	0,5 - 12	1,5	2	100
Cefoxitina	0,19 - ≥256	32	≥256	27
Ciprofloxacino	0,5 - ≥32	2	≥32	18
Levofloxacino	0,25 - ≥32	4	≥32	18
Claritromicina	≤0,016 - 2	0,125	2	54
Imipenem	2 - ≥32	≥32	≥32	18
Linezolid	0,094 - 8	1	4	91
Quinupristina/dalfopristina	0,25 - ≥32	0,5	1,5	45
Tigeciclina	0,023 - 0,38	0,064	0,5	100
<i>M. abscessus</i> (10)				
Amikacina	0,5 - 2	0,75	1	100
Cefoxitina	0,5 - ≥256	32	≥256	10
Ciprofloxacino	0,5 - ≥32	8	≥32	10
Levofloxacino	1 - ≥32	16	≥32	10
Claritromicina	≤0,016 - 4	0,19	2	80
Imipenem	0,75 - ≥32	16	≥32	40
Linezolid	0,094 - 16	1	16	60
Quinupristina/dalfopristina	0,5 - ≥32	4	16	10
Tigeciclina	0,094 - 0,5	0,094	0,25	100

micobacterias no cromógenas y al complejo *Mycobacterium fortuitum*, que incluye a *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense* y varias especies descritas recientemente como *M. septicum*, *M. alvei*, *M. houstonense*, *M. boenickei*, *M. conceptionense*, *M. porcinum*, *M. neworleansense* y *M. brisbanense*. En nuestra serie identificamos 12 especies diferentes, de las que siete de ellas pertenecían a este grupo. Solamente encontramos una cepa escotocromógena de la especie *M. neoaurum*, y ninguna fotocromógena<sup>10</sup>.

La aplicación de técnicas moleculares para la identificación de MCR ha supuesto un aumento de las posibilidades de caracterizar correctamente las especies conocidas y el descubrimiento de otras

nuevas especies. El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción parece ser el método más idóneo, rápido y seguro; la mayoría de los autores opina que debería ser incorporado en los protocolos de los laboratorios clínicos para la identificación de MCR<sup>11</sup>.

El tratamiento de las infecciones producidas por MCR es diferente al de otras micobacteriosis y al de la tuberculosis, principalmente por su resistencia a los fármacos antituberculosos. Además, las distintas especies presentan una gran variabilidad en su respuesta a los antimicrobianos de uso habitual en clínica. Esta circunstancia motiva la necesidad de identificar correctamente cada aislamiento clínico y realizar estudios de sensibilidad.

**Tabla 3. Actividad *in vitro* de 9 antimicrobianos frente a cepas de micobacterias de crecimiento rápido (CMI expresada en mg/L)**

Especies*	ATCC	MSE	MAL	MBR	MMA	MMU	MNE	MPE	MSP	MSM
Amikacina	0,75	0,38	0,38	0,23	0,75	0,38	0,25	0,25	1,5	0,25
Cefoxitina	24	4-6	3	8	8	2	3	3	4	32
Ciprofloxacino	0,047	0,25	0,047	≥32	0,064	1	0,016	0,016	0,016	0,094
Levofloxacino	0,032	0,125	0,023	≥32	0,064	1,5	0,008	0,047	0,004	0,094
Claritromicina	1,5	0,047	8	4	0,047	0,5	0,016	0,032	0,75	12
Imipenem	2	0,094	0,75	2	0,002	0,032	0,125	0,5	2	8
Linezolid	6	0,5	16	1,5	6	2	0,19	2	1,5	1,5
Quinupristina/dalfopristina	≥32	≥32	1	≥32	≥32	≥32	≥32	0,047	≥32	≥32
Tigeciclina	0,016	0,016	≤0,016	0,016	0,023	0,023	≤0,016	0,016	0,032	≤0,016

\*ATCC = *M fortuitum* 6841; MSE = *M senegalense*; MAL = *M alvei*; MBR = *M brumae*; MMA = *M mageritense*; MMU = *M mucogenicum*; MNE = *M neoaurum*; MPE = *M peregrinum*; MSP = *M septicum*; MSM = *M smegmatis*.

Diversos autores han evaluado la sensibilidad de algunas especies en diferentes áreas geográficas, empleando métodos de microdilución en caldo y agar, pero son escasas las publicaciones al respecto. La técnica de E-test evaluada por nosotros parece ser útil para determinar la sensibilidad de MCR, sencilla de realizar y asequible a cualquier laboratorio. Esta técnica, aunque no ha sido recomendada por el CLSI, tiene una buena concordancia con la de referencia de microdilución y es reproducible, pues permite establecer las CMI con acierto, a pesar de las posibles variaciones en el crecimiento de las diferentes micobacterias en cuanto a tamaño de las colonias y tiempo de desarrollo que origina problemas de lectura y reproducibilidad<sup>9,12-15,18,19</sup>.

Los resultados de nuestro estudio coinciden con los de la mayoría de los trabajos publicados y sugieren que, entre los antimicrobianos disponibles, la amikacina es el más efectivo para el tratamiento de las infecciones producidas por las MCR, y que *M fortuitum* es más sensible al conjunto de antimicrobianos que el resto de las especies. En un trabajo previo, realizado con algunas de estas cepas (17 *M fortuitum*, 10 *M chelonae* y 6 *M abscessus*) mediante la técnica de microdilución en caldo, todas las cepas fueron sensibles a amikacina<sup>20</sup>.

Las quinolonas son efectivas frente a *M fortuitum* pero no deben emplearse en infecciones producidas por *M chelonae* y *M abscessus*. Lo mismo sucede con cefoxitina e imipenem, según los resultados de nuestro estudio. Estos resultados no concuerdan con los de la técnica de microdilución ya que la sensibilidad de *M fortuitum* frente a cefoxitina fue

mucho más baja (29,4%), y la de las tres especies frente a imipenem, sin embargo, fue superior (100%, 54,5% y 75%, respectivamente), lo cual desaconsejaría la utilización de cefoxitina para *M fortuitum*<sup>20</sup>.

Claritromicina presenta una buena actividad frente a *M fortuitum* y *M abscessus* pero no frente a *M chelonae*. En relación con el resto de especies incluidas en nuestro estudio, los datos de sensibilidad no pueden ser concluyentes debido al escaso número de cepas ensayadas. No obstante, los resultados son igual de favorables para amikacina y tigeciclina, y la sensibilidad frente a los demás antimicrobianos parece buena a excepción de claritromicina que es el que se muestra menos efectivo para estas especies. En general, las especies más sensibles son: *M senegalense*, *M mageritense*, *M neoaurum*, *M peregrinum* y *M septicum*, las especies *M brumae* y *M smegmatis* son las que presentan un espectro de resistencia mayor<sup>21</sup>.

En publicaciones recientes se postula la utilización de nuevos antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones por micobacterias atípicas, entre los que se citan las nuevas quinolonas, linezolid, tigeciclina, telitromicina o isepamicina. La actividad *in vitro* de estos fármacos parece ser buena pero la experiencia clínica aún es limitada. Según nuestros resultados, tigeciclina presenta una excelente actividad para todas las especies de MCR; linezolid es efectivo frente a *M chelonae*, pero algo menos frente a *M fortuitum* y *M abscessus*; en el caso de quinupristina/dalfopristina, se puede decir que es ineficaz frente a la mayoría de las especies de MCR<sup>12,18,22-24</sup>.

De todo lo expuesto anteriormente, se deduce la importancia de identificar correctamente las

especies de MCR con valor clínico para determinar el tratamiento más apropiado en cada caso. Cuando no sea posible la identificación o no se puedan realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, la experiencia acumulada recomienda incluir amikacina en el tratamiento, además de

otros fármacos de actividad probada. Nuestros datos pueden ofrecer al clínico una orientación para la elección de un tratamiento empírico, en el caso de sospechar una infección por MCR y no disponer de información sobre la sensibilidad de esa especie.

#### REFERENCIAS

1. ADÉKAMBI T, DRANCOURT M. Isolation of *Mycobacterium septicum* from the sputum of a patient suffering from hemoptoic pneumonia. *Res Microbiol* 2006; 157: 466-70.
2. ADÉKAMBI T, FOUCAULT C, LA SCOLA B, DRANCOURT M. Report of two fatal cases of *Mycobacterium mucrogenicum* central nervous immunocompetent patients. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 873-80.
3. ERGAN B, CÖPLÜ L, ALP A, ARTVINLI M. *Mycobacterium smegmatis* pneumonia. *Respirology* 2004; 9: 283-5.
4. HOFLING-LIMA AL, DE FREITAS D, SAMPAIO JL, LEO SC, CONTARINI P. *In vitro* activity of fluoroquinolones against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae* causing infectious keratitis after LASIK in Brazil. *Cornea* 2005; 24: 730-4.
5. LEE SA, RAAD II, ADACHI JA, HAN XY. Catheter-related bloodstream infection caused by *Mycobacterium brumae*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5429-31.
6. OH WS, KO KS, SONG JH, LEE MY, RYU SY, HEO S ET AL. Catheter-associated bacteremia by *Mycobacterium senegalense* in Korea. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 107-11.
7. DE GROOTE MA, HUITT G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1756-63.
8. SUNGKANUPARPH S, SATHAPATAYAWONGS B, PRACHARTAM R. Infections with rapidly growing mycobacteria: report of 20 cases. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 198-205.
9. USLAN DZ, KOWALSKI TJ, WENGENACK NL, VIRK A, WILSON JW. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility. *Arch Dermatol* 2006; 142: 1287-92.
10. SCHINSKY MF, MOREY RE, STEIGERWALT AG, DOUGLAS MP, WILSON RW, FLOYD MM ET AL. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third-biovariant complex: Description of *Mycobacterium bonickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov., *Mycobacterium concordense* sp. nov., *Mycobacterium brisbanense* sp. nov., and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 1653-67.
11. BRUNELLO F, LIGOZZI M, CRISTELLI E, BONORA S, TORTOLI E, FONTANA R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp 65 gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2799-806.
12. YANG SC, HSUEH PR, LAI HC, TENG LJ, HUANG LM, CHEN JM ET AL. High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1958-62.
13. HOFFNER SE, KLINTZ L, OLSSON-LILJEQUIST B, BOLMSTRÖM A. Evaluation of E-test for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium chelonae* and *M fortuitum*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1846-9.
14. BIEHLE JR, CAVALIERI SJ, SAUDOUBLE MA, GETSINGER LJ. Evaluation of E-test for susceptibility of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1760-4.
15. KOONTZ F. E-test for susceptibility testing of rapid growing mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 19: 183-6.
16. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard NCCLS document M24-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA. 2003.
17. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST) STEERING COMMITTEE. Eucast technical note on tigecycline. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1147-9.
18. FERNÁNDEZ-ROBLAS R, ESTEBAN J, CABRIA F, LÓPEZ JC, JIMÉNEZ MS, SORIANO F. *In vitro* susceptibilities of rapid growing mycobacteria to telithromycin (HMR 3647) and seven other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 181-2.
19. BROWN-ELLIOT BA, WALLACE RJ, BLINKHORN R, CRIST CJ, MANN LB. Comparison of *in vitro* activities of gatifloxacin and ciprofloxacin against four taxa of rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3283-5.
20. RUIZ-ARAGÓN J, GARCÍA-AGUDO L, FLORES S, RODRÍGUEZ MJ, MARÍN P, GARCÍA-MARTOS P. Sensibilidad a los antimicrobianos de micobacterias de crecimiento rápido. *Rev Esp Quimioter* 2007; 20: 429-32.
21. VEMULAPALLI RK, CANTLEY JR, STEED LL, KNAPP TL, THIELMAN NM. Emergence of resistance to clarithromycin during treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection: case report and literature review. *J Infect* 2001; 43: 163-8.
22. WALLACE RJ JR, BROWN-ELLIOT BA, WARD SC, CRIST CJ, MANN LB, WILSON RW. Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 764-7.
23. WALLACE RJ JR., BROWN-ELLIOT BA, CRIST CJ, MANN LB, WILSON RW. Comparison of the *in vitro* activity of the glycolcycline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3164-7.
24. BOSÓ-RIBELLES V, ROMÁ-SÁNCHEZ E, SALAVERT-LLETÍ M, HERNÁNDEZ-MARTÍ V, POVEDA-ANDRÉS JL. La tigeciclina, el primer antibiótico de una nueva clase: las glicilciclinas. *Rev Esp Quimioter* 2007; 20: 19-35.