



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

PANORAMA ACTUAL ASOCIADO A LAS MICOBACTERIAS  
NO TUBERCULOSAS QUE AFECTAN AL HUMANO

TRABAJO MONOGRAFICO DE  
ACTUALIZACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
PRESENTA:  
FABIOLA MONROY ZAMORATE



MEXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2006

m 351 978



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Raúl Garza Velasco
Vocal	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
Secretario	Profa. Adriana Guadalupe Mejía Chávez
1er. Suplente	Profa. Patricia Elvira Berrón Ruiz
2º. Suplente	Prof. Alejandro Camacho Cruz

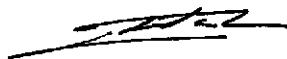
Sitio donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química UNAM y otras diversas bibliotecas de los sectores académicos y de salud.



QFB. Raúl Garza Velasco

Asesor



Fabiola Monroy Zamorate

Sustentante

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Fabiola Monroy Zamorate

FECHA: 15 de Diciembre de 2005

FIRMA: [Handwritten Signature]



## DEDICATORIAS

A mis padres, con todo mi cariño,  
porque sin su apoyo, fortaleza y  
confianza no hubiera llegado hasta aquí,  
por caminar siempre a mi lado e  
impulsarme a seguir intentándolo. Por  
todo su esfuerzo... GRACIAS.

A mi familia: abuelitos (†),  
abuelitas, tíos y primos que  
siempre creyeron en mí.

A mis amigos por su compañía y ayuda,  
por los buenos ratos y aventuras durante  
estos años.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus  
bendiciones

A mi asesor, por la orientación en  
la realización de este trabajo.

A la Facultad de Química de la  
UNAM y sus profesores



## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	3
<b>CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS</b>	4
<b>PATOGENIA Y PATOLOGÍA</b>	8
Factores predisponentes	10
Infecciones pulmonares	11
Adenitis	13
Enfermedad de Crohn	15
Enfermedad diseminada	16
Infecciones en piel, hueso y tejidos blandos	19
Enfermedades nosocomiales	24
Otras enfermedades	26
<b>FACTORES DE VIRULENCIA</b>	27
Micolactonas	27
Envoltura celular	30
Glicopeptidolípidos	32
Lipomanana (LMs) y lipoarabinomanana (LAMs)	34
Ácidos micólicos	40
Glicanos	42
2,3-Di-O-Aciltrehalosa	42
Fosfolipasas	43
Adherencia, supervivencia y replicación dentro de los macrófagos	45
Inhibición de la formación del fagolisosoma	50
Escape del fagosoma	54
Formación de granulomas	54
Productos de genes que responden a la oxidación	55
Catalasa-peroxidasa	55
Superóxido dismutasa	56

Proteínas	58
Proteína ESAT-6	58
Proteína PE-PGRS	59
Proteínas de choque térmico	59
Proteína exportadora de repetición	60
Fotocromogenicidad	61
Resistencia a condiciones ácidas	61
Resistencia a fármacos	62
<b>DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO</b>	<b>70</b>
Muestra	71
Examinación histopatológica	72
Cultivo	72
Microscopía	74
Identificación	76
Métodos moleculares	83
Pruebas de ácidos nucleicos	84
Métodos basados en PCR	85
Microarreglos de ADN o arreglos de oligonucleótidos de alta densidad	95
Análisis de ácidos micólicos	95
Intradermoreacción	100
Determinación de perfiles de sensibilidad	101
Difusión en agar	103
Microdilución en caldo	103
Prueba E	104
Elución de discos en agar	104
Recomendaciones para algunas especies	106
MAC	106
<i>M. kansasii</i>	108
<i>M. marinum</i>	108
Especies de crecimiento lento	108

Especies de crecimiento rápido	109
<b>ASPECTOS ASOCIADOS AL TRATAMIENTO</b>	111
Profilaxis	111
Tratamiento quirúrgico	111
Uso de antibióticos	112
Rifamicinas	113
Macrólidos	113
Fluoroquinolonas	114
Aminoglucósidos	114
Cefalosporinas	114
Carbapenems	114
Tetraciclinas	115
Oxazilidinonas	115
Ketólidos	115
Etionamida	115
Clofazimina	115
Trimetoprim-sulfametoxazol	116
Streptograminas	116
Enfermedad diseminada	120
Enfermedad pulmonar	120
Adenitis	120
Infecciones en piel, hueso y tejidos blandos	121
Otras infecciones	122
Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	123
<i>M. kansasii</i>	124
Micobacterias de crecimiento rápido (MCR)	125
<i>M. haemophilum</i>	128
<i>M. xenopi</i>	128
<i>M. malmoense</i>	128
<i>M. marinum</i>	129
<i>M. ulcerans</i>	129

Alternativas en estudio	130
Mefloquina	130
Terapia con fagos	130
Inmunoterapia	131
IL-2	132
IL-12	132
IFN- $\gamma$	132
GM-CSF	134
TNF- $\alpha$	134
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>136</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>141</b>



## INTRODUCCIÓN

El número de miembros del género *Mycobacterium* parece estar en permanente aumento: en 2003, alcanzó la cifra de 95 especies y, para el presente año, se ha llegado a un total de 115; además, mientras *Mycobacterium leprae* y el complejo *Mycobacterium tuberculosis* causan enfermedades específicas, las cepas restantes del género son saprófitas, pero muchas de ellas figuran como oportunistas o como patógenas consistentes y reciben la denominación de micobacterias atípicas, no tuberculosas (MNT) o MOTT (*mycobacteria other than tubercle bacilli*) (39, 62).

Entre las más de 90 especies de MNT, 1/3 se han asociado a enfermedades humanas de pulmones, glándulas linfoides, piel, heridas, huesos, infecciones nosocomiales y afecciones diseminadas; de hecho, su impacto ha aumentado por los índices de mortalidad y morbilidad de los pacientes con SIDA infectados por estas bacterias y, a nivel internacional, han proliferado los estudios epidemiológicos, ecológicos, genéticos, moleculares y fisiológicos sobre estos microorganismos, lo cual ha generado más información acerca de ellos.

El aislamiento de las micobacterias a partir de muestras clínicas y su rápida identificación, resultan determinantes para establecer un diagnóstico acertado y un régimen terapéutico apropiado; por tal motivo, se han desarrollado importantes técnicas bioquímicas y moleculares que continúan evolucionando y adecuándose a las necesidades actuales de los laboratorios de diagnóstico.

Paralelamente, la quimioterapia relacionada con el tratamiento de las micobacteriosis se ha venido complicando dramáticamente, debido a que estos microorganismos han desarrollado resistencia hacia un amplio número de antibióticos, por lo que las investigaciones también se han enfocado en la búsqueda de nuevos agentes antimicobacterianos más efectivos, de nuevos sitios "blanco" y de los factores de virulencia que contribuyen a la resistencia y/o a la patogenia.

El presente trabajo aborda las más relevantes temáticas acerca de las MNT, incluyendo lo referente a sus factores de virulencia, los cuales sustentan al proceso infectivo y representan la base de los estudios sobre el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas; así mismo, se presenta el panorama actual de los métodos de laboratorio que conducen al diagnóstico de las micobacteriosis.

## OBJETIVOS

- Señalar las principales especies de MNT y asociarlas a las enfermedades que originan en el humano, mencionando los aspectos sobresalientes de estas últimas, en cuanto a sintomatología, epidemiología y terapéutica.
  
- Describir los factores de virulencia que contribuyen a la patogenia de las micobacteriosis, relacionándolos con los cuadros patológicos correspondientes y con el progreso de los padecimientos implicados.
  
- Subrayar la metodología actual para realizar el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades causadas por las MNT, haciendo énfasis en los fundamentos involucrados.

## I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*, incluye más de 100 especies perfectamente caracterizadas y se constituye por especies patógenas y saprófitas, destacando las integrantes del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*), *M. leprae* y las denominadas MOTT (*Mycobacteria other than tubercule bacilli*), micobacterias no tuberculosas (MNT) o micobacterias atípicas, término que se originó porque se pensaba que se trataba de cepas inusuales de *M. tuberculosis* (39,62).

Estas bacterias son aerobias obligadas, inmóviles, no esporuladas, no capsuladas, de morfología variable, miden 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho por 1 a 10  $\mu\text{m}$  de largo y su contenido genómico de guanina y citosina es elevado (60 a 70%) (4).

Es importante subrayar que los microorganismos en cuestión se pueden dividir en dos grupos, con base en su tiempo de crecimiento (4, 51, 59):

➔ **Micobacterias de crecimiento lento**, las que tardan 2 a 4 semanas en desarrollar a temperatura óptima, incluyendo a los patógenos del complejo *M. tuberculosis*, *M. leprae*, el complejo *M. avium*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. cooki*, *M. celatum*, *M. interjectum*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. ulcerans* y *M. xenopi*, entre otros.

➔ **Micobacterias de crecimiento rápido**, las que crecen en menos de 7 días, tales como *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. elephantis* y *M. smegmatis*.

Es oportuno considerar que la anterior división también está sustentada mediante análisis del gen que codifica para el ARNr 16S, pero también se han propuesto otros esquemas de clasificación clínica, por ejemplo, uno de éstos agrupa las MNT aisladas de seres humanos en cuatro grupos principales basándose en la enfermedad que ocasionan (pulmonares, ganglionares, cutáneas y diseminadas) (44, 59).

Las micobacterias se clasifican como bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), ya que los procedimientos comunes para teñirlas (Ziehl-Neelsen, Kinyoun, auramina rodamina, etc.) se fundamentan en la baja permeabilidad de su pared celular particularmente rica en ácidos micólicos; una vez teñidas con colorantes básicos, retienen el color correspondiente, aún después del

uso de ácidos mezclados con alcohol (4). Su característica pared celular las protege de la desecación, de los desinfectantes, e inclusive, de la acción de algunos antibióticos (60).

Las MNT se encuentran ampliamente distribuidas en diversos ambientes, pudiéndose detectar en depósitos naturales y municipales de agua, suelo y animales; muestran una gran capacidad para sobrevivir en sitios con escasos nutrimentos y toleran temperaturas extremas, por lo que pueden estar presentes en los depósitos de agua caliente y en máquinas de hielo. Entre las especies más termo-resistentes se cuentan las del complejo *M. avium*, así como *M. xenopi*, *M. phei* y *M. chelonae* (86).

Para la clasificación de las MNT, Runyon consideró su tiempo de crecimiento y capacidad para producir pigmentos carotenoides amarillos, naranjas o rojos. Los grupos de Runyon, son (36, 84, 85):

- ⊙ Grupo I. **Fotocromógenos**. Incluye a las especies que producen pigmento solo cuando son expuestas a la luz. Ej.: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. asiaticum*.
  
- ⊙ Grupo II. **Escotocromógenos**. Está integrado por las micobacterias que pueden producir el pigmento tanto en presencia como en ausencia de luz. Ej.: *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. xenopi*.

- © Grupo III. **No fotocromógenos.** A este grupo pertenecen las especies que no producen pigmento aún después de ser expuestas a la luz. Ej.: *M. avium*, *M. branderi*, *M. celatum*, *M. conspicum*, *M. gevanense*, *M. haemophilum*, *M. intracellulare*, *M. malmoense*, *M. terrae*, *M. ulcerans*.
  
- © Grupo IV. **Especies de crecimiento rápido.** Es formado por las especies que tienen la habilidad de crecer en medio sólido en siete o menos días. No producen pigmento, con excepción de *M. flavescens*. Ej.: *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*.

Cabe señalar que la morfología microscópica de las MNT en medio líquido es diferente a la del complejo *M. tuberculosis*, por la presencia del factor cordón en este último, glucolípidos que origina su disposición en cadenas y en paralelo, fácilmente detectable al microscopio (112).

## II. PATOGENIA Y PATOLOGÍA

Si bien el género *Mycobacterium* incluye más de 100 especies, la mayoría de las cuales son saprofitas, una parte importante de ellas han sido reconocidas como patógenas desde el inicio del último siglo. De hecho, se estima que las infecciones causadas por MNT representan entre el 0.5 y el 30% del total de las enfermedades ocasionadas por micobacterias. Las especies atípicas asociadas a padecimientos en humanos, son (19, 53, 62):

- Complejo *M. avium* (MAC)<sup>1</sup>
- *M. abscessus*
- *M. asiaticum*
- *M. bohemicum*
- *M. branderi*
- *M. celatum*
- *M. chelonae*
- *M. conspicuum*
- *M. elephantis*
- *M. flavescens*
- *M. fortuitum*
- *M. genavense*
- *M. goodii*
- *M. gordonae*
- *M. habana*
- *M. haemophilum*
- *M. heckeshornense*
- *M. heidelbergense*
- *M. immunogenum*
- *M. interjectum*
- *M. kansasii*
- *M. lentiflavum*
- *M. malmoense*
- *M. marinum*
- *M. mucogenicum*
- *M. neoaurum*
- *M. nonchromogenicum*
- *M. palustre*
- *M. paratuberculosis*
- *M. peregrinum*
- *M. scrofulaceum*
- *M. septicum*
- *M. shimoidei*
- *M. simiae*
- *M. smegmatis*
- *M. szulgai*
- *M. terreae*
- *M. thermoresistibile*
- *M. triplex*
- *M. ulcerans*
- *M. vaccae*
- *M. wolinskyi*
- *M. xenopi*

---

<sup>1</sup> Incluye a *M. intracellulare* y *M. avium*



Las MNT han sido identificadas principalmente como agentes etiológicos de infecciones pulmonares y extrapulmonares (en glándulas linfoides, piel, huesos, tejidos blandos y heridas); las afecciones presentan diversas sintomatologías y pueden manifestarse como localizadas o diseminadas, dependiendo de la predisposición y del grado de la deficiencia inmune que padezca el paciente. Evidentemente, el aislamiento de MNT no siempre indica su participación en algún proceso patológico y, por otra parte, existe una notable variabilidad geográfica en la prevalencia de las especies responsables; por ejemplo, en los Estados Unidos la incidencia de padecimientos debidos a especies del complejo *M. tuberculosis* ha disminuido, lo que resulta contrario a lo ocurrido con las infecciones causadas por MNT (36, 44, 62, 107).

Además, es realmente poco lo que se ha logrado establecer respecto a las formas de contagio, si bien se piensa que no son transmitidas de persona a persona, aunque algunas patologías parecen originarse por ingestión, inhalación de aerosoles o situaciones iatrogénicas (44, 62).

En general, se considera que la incidencia de las enfermedades producidas por MNT ha aumentado, lo que se atribuye a cambios en la virulencia de las micobacterias y al incremento en el número de individuos inmunocomprometidos -como aquellos que padecen SIDA-; sin embargo, también debe tomarse en cuenta que ahora se dispone de técnicas más específicas y sensibles para identificar a estos microorganismos (62, 107).

Entre las enfermedades causadas por MNT están incluidas la linfadenitis cervical, enfermedad pulmonar, infecciones diseminadas en casos de deficiencia inmunitaria de tipo celular, enfermedad de Crohn y, con menor frecuencia, las infecciones de la piel, osteomielitis, otitis media e infecciones en heridas y en las incisiones por donde se insertan catéteres (19, 24, 62).

Las manifestaciones clínicas implicadas dependen del órgano afectado, al margen de que suelen presentarse síntomas inespecíficos tales como fiebre persistente, sudores nocturnos, anemia, pérdida de peso, anorexia, diarrea, mialgia y adenopatía (62).

### **Factores predisponentes**

Las infecciones debidas a MNT son una causa importante de morbilidad y mortalidad en individuos con inmunidad local o sistémica alterada, como la que caracteriza a los pacientes con SIDA o a quienes se administran agentes inmunosupresores por haber sido sometidos a transplantes. Otros factores de riesgo incluyen diversas enfermedades pulmonares y esofágicas, gastrectomía previa, alcoholismo crónico, incisiones quirúrgicas, inyecciones y heridas punzantes (4, 41, 62, 85).

## **Infecciones pulmonares**

El órgano más comúnmente afectado por MNT es el pulmón. Las manifestaciones clínicas de las infecciones pulmonares causadas por estos microorganismos son similares a las observadas en los casos de tuberculosis y la infección puede producir la destrucción pulmonar. Los criterios de diagnóstico se han estandarizado a través de las guías publicadas por la Sociedad Torácica Americana (ATS) e incluyen pruebas radiológicas, clínicas y microbiológicas (84).

Sus signos y síntomas más frecuentes son fiebre, sudores nocturnos, tos crónica, secreción de esputo, disnea progresiva, pérdida de peso, fatiga, hemoptisis y dolor en el pecho (4, 84). La evaluación del paciente suele dificultarse debido a los síntomas producidos por enfermedades pulmonares co-existentes y predisponentes tales como la enfermedad obstructiva crónica, bronquiectasia (destrucción y dilatación anormal de las vías respiratorias producida por una inflamación recurrente), fibrosis quística, escoliosis torácica, neumoconiosis (asbestosis y silicosis), pulmón negro, proteinosis alveolar pulmonar, bronquitis crónica y enfisema.

La enfermedad pulmonar predomina en pacientes masculinos que fuman y presentan enfisema, pero también se han reportado casos en mujeres de edad avanzada que no tienen alguno de los factores de riesgo ni fuman (41, 62, 84, 96).

Las cepas del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y *M. kansasii* han sido identificadas frecuentemente como agentes causales de cuadros pulmonares (62). Son patógenos oportunistas distribuidos ampliamente en el medio ambiente (suelo y agua), pueden infectar a diversas especies incluyendo a las aves, cerdos y humanos, originando infecciones asintomáticas, con significado clínico, e inclusive, enfermedades mortales. Sin embargo, aún continúan sin definirse completamente el potencial micobacteriano para infectar, la posible reactivación de la enfermedad, ni las fuentes ambientales responsables de la infección en diferentes poblaciones o las rutas de transmisión (96).

Entre otras especies reportadas como patógenas pulmonares, figuran: *M. abscessus*, *M. asiaticum*, *M. branderi*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. elephantis*, *M. fortuitum*, *M. habana*, *M. haemophilum*, *M. heckeshornense*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. vaccae* y *M. xenopi* (14, 18, 44, 62, 84, 93, 106).

*M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* son las especies que se aíslan con mayor frecuencia de las muestras provenientes de enfermos con fibrosis quística; *M. heckeshornense* parece afectar a pacientes con o sin enfermedad pulmonar preexistente y puede causar múltiples cavidades en el pulmón; *M. scrofulaceum* se asocia a infecciones pulmonares localizadas y *M. xenopi* se ha encontrado en pacientes con otras enfermedades subyacentes del pulmón (89, 93).

Otra enfermedad pulmonar que se ha identificado con relativa frecuencia es la neumonitis por hipersensibilidad, la cual implica a pacientes inmunocompetentes que se han expuesto a aerosoles con micobacterias: debido a la naturaleza hidrofóbica de estas bacterias, éstas suelen encontrarse en mayor cantidad en la interfase aire-agua, facilitando su unión a partículas presentes en el aire. La enfermedad se asocia a tinas calientes y albercas, por lo que las personas afectadas más comúnmente son las que están en contacto con estas fuentes acuáticas debido a su trabajo o a recreación (84, 86).

### **Adenitis**

La forma más conocida de adenitis debida a MNT es la linfadenitis cervical e implica a niños menores de cinco años, aunque sin duda son pocos los casos de esta enfermedad a pesar de la ubicuidad de las micobacterias (53, 84, 86).

En este contexto, se ha sugerido que puede existir cierta predisposición, denominada susceptibilidad mendeliana, a las enfermedades por micobacterias, por existir alguna mutación en los genes *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B* o *IL12RB1*, que altera la inmunidad mediada por el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Aparentemente, se trata de un mecanismo patogénico común en cuanto a las infecciones por micobacterias (17).

La primera especie aislada como agente causal de linfadenitis cervical fue *M. scrofulaceum*, si bien con el tiempo se han identificado otras micobacterias atípicas responsables de la enfermedad: *M. abscessus*, *M. bohemicum*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. elephantis*, *M. fortuitum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. malmoense*, *M. palustre*, *M. triplex* y *M. xenopi*. Actualmente, el MAC es considerado como la principal causa de linfadenitis cervical a nivel mundial; de hecho, en fechas recientes, su incidencia está aumentando en los Estados Unidos y en otros diversos países, aunque existen claras diferencias en cuanto a la distribución geográfica de las otras especies que producen esta enfermedad. Por ejemplo, mientras en Europa la segunda especie en importancia es *M. malmoense*, en los Estados Unidos ese lugar es ocupado por *M. scrofulaceum* y los aislamientos de *M. malmoense* son verdaderamente raros (4, 84, 53).

Generalmente, la enfermedad es precedida por una infección del tracto respiratorio superior, suele afectar a los nódulos linfáticos cervicales, submandibular, submaxilar o periauricular y se manifiesta como un absceso sólido, unilateral, que en la mayoría de los casos no es doloroso al tacto. La piel puede evidenciar una decoloración púrpura y, en algunos casos, la formación de una fístula; la inflamación permanece durante semanas o meses, el uso de antibióticos no produce mejoría y un ultrasonido puede mostrar pequeñas calcificaciones que sugieren la enfermedad por

micobacterias. Para su diagnóstico certero se debe considerar que no haya historia de exposición a tuberculosis (18, 84).

### **Enfermedad de Crohn**

El avance en las técnicas de identificación y aislamiento ha permitido reconocer a *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, también llamada *M. paratuberculosis*, como el principal agente etiológico de la enfermedad de Crohn. La participación de esta micobacteria también se ha confirmado poniendo en evidencia anticuerpos séricos contra los antígenos p35 y p36 de *M. paratuberculosis* en numerosos pacientes (19).

La enfermedad tiene diferentes etiologías: susceptibilidad genética, desbalance inmune y presencia de otros factores tales como infecciones y dieta, si bien se ha demostrado que ninguno de dichos factores causan la enfermedad en forma aislada. A partir de los datos obtenidos mediante cultivos y técnicas de hibridación *in situ*, se ha estimado que la proporción de pacientes infectados con *M. paratuberculosis* fluctúa entre 35% y 40% (19).

*M. paratuberculosis* provoca una respuesta inflamatoria crónica mediada por TH1; la destrucción del tejido se traduce en ulceraciones y fístulas en el intestino. Los síntomas de la enfermedad de Crohn incluyen dolor en la parte inferior derecha del abdomen, fiebre y diarrea; el cuadro afecta al intestino delgado, especialmente a la válvula íleo-cecal, pero también se le detecta en

el intestino grueso, duodeno, esófago (muy raro) y estómago, provocando estrechez en el colon y, por lo tanto, estreñimiento y dilatación gástrica, además de la formación de fístulas entre el intestino delgado y el grueso (19).

*M. paratuberculosis* también es el agente causal de una enfermedad inflamatoria que afecta el intestino de rumiantes y mamíferos tales como monos y chimpancés; a dicha patología se le conoce como enfermedad de Johne y sus signos (diarrea, pérdida de peso e inflamación transmural granulomatosa difusa) y epidemiología (alta incidencia y largo periodo de incubación) son muy similares a los observados en la enfermedad de Crohn (19, 24).

### **Enfermedad diseminada**

Si bien casi todas las MNT causan infecciones diseminadas, resultan más frecuentes las debidas a MAC, seguidas por las de *M. kansasii* (4). La patología se presenta más comúnmente en pacientes inmunocomprometidos, destacando quienes están afectados por inmunodeficiencias familiares (en especial los asociados a defectos en los receptores de IFN- $\gamma$ ), los enfermos de linfoma y leucemia (principalmente leucemia de las células pilosas), los que están bajo terapia de esteroides, los que padecen con enfermedad vascular del colágeno y los que han recibido transplantes de médula ósea o algún órgano. Las MNT originan el 0.8 a 6% de las infecciones posteriores a



transplante renal y su frecuencia es menor después de los trasplantes de corazón (4, 8, 84).

La enfermedad diseminada representa una complicación común en pacientes con SIDA en estado avanzado; aproximadamente, un 50% de éstos son más susceptibles a las infecciones por MAC y la probabilidad de que desarrollen el cuadro es de 10 a 20%, sobre todo cuando su cuenta de linfocitos CD4+ es menor a 50-100 células/mm<sup>3</sup>. Al menos el 25% de los pacientes están infectados con dos o más cepas de micobacterias, lo que indica su posible contacto con diversas poblaciones presentes en una misma fuente ambiental, o bien, exposiciones múltiples en diferentes ambientes (84).

Es conveniente mencionar que el número de casos de esta patología ha venido disminuyendo al aplicarse un mejor cuidado médico, una terapia antirretroviral altamente activa (HAART) o las medidas profilácticas correspondientes (78, 84).

Los signos y síntomas asociados a la enfermedad diseminada son muy diversos, destacando la fiebre persistente, fatiga, pérdida de peso, anemia, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea (4, 84).

Los estudios epidemiológicos no han logrado identificar con claridad las posibles fuentes de infección pero, a través de técnicas moleculares, se ha detectado la colonización por MNT (en especial MAC) a partir de los sistemas

de distribución de agua municipales y de los hospitales, así como de las máquinas de hielo, tanques de oxígeno y aparatos de succión (14, 41, 84, 85, 40).

La transmisión a través del agua potable es muy factible, debido a que *M. scrofulaceum* y las especies pertenecientes al MAC son resistentes a los agentes más utilizados para la desinfección acuifera: cloro, cloramina, dióxido de cloro, ozono y otros desinfectantes comunes tales como los compuestos cuaternarios de amonio, los fenoles y el glutaraldehído (40).

En los pacientes con SIDA, la infección suele ocurrir vía el tracto gastrointestinal; por ejemplo, *M. avium* se establece en la mucosa intestinal, posteriormente infecta a los macrófagos de la submucosa y se multiplica en su interior, pudiendo diseminarse dentro de ellos hacia una gran variedad de tejidos susceptibles (49). Los estudios correspondientes han mostrado que las micobacterias invaden hígado, bazo, médula ósea y tracto gastrointestinal, alcanzando proporciones de  $10^7$ - $10^{10}$  UFC/g de tejido (84).

En personas con bajas cantidades de células CD4+, los análisis rutinarios de sangre pueden ayudar a detectar la presencia del MAC en fases tempranas en las que la terapia resulta muy exitosa; en la mayoría de los pacientes se observa anemia y, ocasionalmente, niveles elevados de fosfatasa alcalina (84).

Cuando el enfermo se encuentra bajo terapia conjunta antirretroviral y antimicobacteriana, además de la posible interacción entre fármacos, puede ocurrir el síndrome de reconstitución inmune; éste se caracteriza por una inflamación local muy agresiva, linfadenitis y lesiones granulomatosas locales, lo que en ocasiones se interpreta erróneamente como fallo de la terapia antimicobacteriana, sin embargo, los hemocultivos resultan negativos para micobacterias (84, 4).

Los estudios epidemiológicos muestran que el riesgo de padecer enfermedad diseminada es mayor en los países desarrollados, pero no se ha establecido si ello se debe a factores genéticos respecto a la inmunidad contra micobacterias o a diferencias geográficas relacionadas con la mayor virulencia de las cepas (84).

### **Infecciones en piel, huesos y tejidos blandos**

Estos padecimientos pueden ocurrir en individuos de cualquier edad; en la mayoría de los casos, los pacientes son relativamente sanos, pero adquieren la enfermedad al sufrir fracturas expuestas al ambiente (suelo y agua) o bien al ser intervenidos quirúrgicamente. Su incidencia en individuos inmunocomprometidos ha aumentado y el uso de corticoesteroides representa un serio factor de riesgo; inclusive, se han reportado infecciones por *M. marinum* en pacientes con enfermedad reumática que son tratados con terapia inmunodepresiva (18, 48).

Entre los principales agentes causales de infecciones de la piel y tejidos blandos<sup>2</sup> se encuentran las micobacterias de crecimiento rápido (*M. chelonae* y *M. fortuitum*), MAC, *M. flavescens*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. terreae*, *M. ulcerans*, *M. vaccae*, *M. wolinskyi* y, con menor frecuencia, *M. kansasii*. En pacientes con inmunodepresión crónica, *M. fortuitum* y *M. chelonae* son las especies responsables del 95% de los casos de infecciones cutáneas diseminadas (6, 14, 48, 61, 62, 84, 113, 114).

Generalmente, las afecciones tienen su origen en heridas punzantes tales como las que aparecen cuando se pisan clavos contaminados; así mismo, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. nonchromogenicum* han sido identificados como los agentes causales de infecciones asociadas a la práctica de la acupuntura (62, 108).

Las manifestaciones clínicas incluyen abscesos que drenan material mucopurulento, úlceras, nódulos, celulitis, pústulas, seromas, lesiones verrugosas, necrosis y granulomas cutáneos que pueden evolucionar a placas endurecidas. Las lesiones suelen ser indoloras y comúnmente inician como nódulos violáceos que se ulceran posteriormente. La infección del tejido blando evidencia eritemas, dolor, calor e hinchazón local (48, 84, 107).

---

<sup>2</sup> Incluye los ligamentos, tendones y músculos del cuerpo.

A continuación, se describen las características más relevantes de las enfermedades asociadas a las principales especies de MNT:

**MAC.** La infección por este grupo de micobacterias es más común en personas de edad avanzada, aunque también pueden padecerla los niños inmunocompetentes, los adultos y los pacientes con SIDA; puede ser recurrente, en ocasiones diseminada y suele presentarse como consecuencia de algún trauma, procedimientos quirúrgicos o cosméticos, terapia con esteroides y sarcoidosis. Normalmente se localiza en tejidos blandos o en la superficie anterior de las manos y muñecas (84).

Frecuentemente los pacientes son mal diagnosticados con artritis u otras enfermedades inflamatorias, llegando a recibir tratamientos con corticosteroides, lo que origina severas complicaciones de la enfermedad, incluyendo osteomielitis, tenosinovitis y artritis séptica. La infección recurrente por el MAC suele asociarse a una delección en el residuo 818 del receptor para IFN- $\gamma$  (84).

***M. marinum.*** El cuadro patológico debido a esta especie se conoce como "granuloma del tanque de peces" y se origina en la exposición a agua salada y a agua dulce; los casos reportados incluyen a personas que tienen peceras, que realizan actividades en la industria pesquera y que trabajan con agua o la utilizan con propósitos recreativos. Entre las principales manifestaciones

clínicas de la enfermedad destacan la formación de nódulos indoloros en las extremidades, los cuales aparecen 2 a 6 semanas después del daño en la piel; la tenosinovitis o tendovaginitis (inflamación aguda o crónica del tendón y de la vaina que lo recubre y protege), se presenta cuando las heridas son penetrantes. En personas inmunocompetentes, las lesiones aparecen en las extremidades y, aunque la infección sistémica es rara, la patología puede alcanzar huesos, articulaciones y tendones (36, 48, 62, 83).

***M. ulcerans.*** La úlcera de Buruli afecta principalmente a niños de 5 a 14 años (70% de los casos) y corresponde a una enfermedad necrosante de piel y huesos causada por una familia de toxinas (micolactonas) producidas por esta especie. Cabe subrayar que se trata de la tercera enfermedad micobacteriana más común, sólo superada en frecuencia por la tuberculosis y la lepra, y que su distribución es mundial, aunque destaca principalmente en regiones con climas tropicales. Se han reportado casos en más de 30 países de África, América Latina, Asia, el Pacífico occidental y Australia; empero, en África Occidental afecta al 22% de la población. Los casos se concentran en zonas geográficas cercanas a grandes masas de agua, como ríos, lagos o pantanos y, aunque las formas en las que se adquiere aún no se conocen con exactitud, los estudios epidemiológicos y el uso de métodos moleculares han permitido establecer la posible participación de algunos insectos acuáticos en el ciclo de su transmisión, asegurándose que no existe indicio alguno que sugiera el contagio persona a persona (33, 35, 81, 82).

Los factores de riesgo identificados hasta ahora incluyen al turismo en las zonas endémicas y a la presencia de lesiones cutáneas que entran en contacto con insectos o agua contaminada (33, 82).

La micolactona micobacteriana causa la necrosis de la piel y del tejido subcutáneo y sus efectos inmunosupresores favorecen el avance silencioso de la enfermedad; la falta de fiebre o dolor se suma a la carencia de métodos de diagnóstico que permitan identificar rápidamente al microorganismos, lo que explica porqué las personas afectadas no reciben tratamientos tempranos que posibiliten curaciones exitosas en menor tiempo (33, 82, 84).

Las lesiones implicadas pueden ser no ulcerativas (pápulas, nódulos, placas endurecidas o edema), ulcerativas, cicatrizantes y hasta trastornos óseos. Durante la fase inicial aparece un nódulo indoloro que, en el caso de ser extirpado, la enfermedad desaparece. Sin embargo, cuando no se aplica tratamiento adecuado alguno, el nódulo evoluciona hacia una ulceración cutánea masiva que posteriormente provoca la destrucción de huesos y órganos tales como mamas, ojos y genitales, llegando a originar incapacidad permanente hasta en un 25% de los enfermos (33, 82).

La terapéutica con antibióticos no es efectiva cuando ya se ha desarrollado la úlcera; en este sentido, los autores consideran que es probable que el microorganismo no esté presente en las lesiones o que la destrucción del tejido subcutáneo impide la entrada de los fármacos (33, 82).

***M. haemophilum***. Esta micobacteria infecta piel, huesos, articulaciones, pulmones y ganglios linfáticos. Las lesiones cutáneas frecuentemente se ulceran y se extienden por el pecho y las extremidades; de hecho, en pacientes con SIDA, las manifestaciones son precisamente de esta índole – lesiones cutáneas diseminadas– (83).

***M. terreae***. Se asocia comúnmente a tenosinovitis y, dentro de los factores predisponentes, destaca la práctica de la jardinería y la exposición al suelo (84).

#### **Enfermedades nosocomiales**

Bajo esta denominación se clasifica a las infecciones que se producen durante la estancia en los hospitales y las manifestaciones clínicas implicadas dependen en gran medida de la especie de MNT, de la ruta de infección y de las condiciones médicas subyacentes (85).

La infección del tracto respiratorio por *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. xenopi*, se asocia a la presencia de estos microorganismos en los sistemas de abastecimiento de agua, máquinas de hielo, albercas de hidroterapia e instrumental médico. También han reportado infecciones por *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae* en pacientes sometidos a diálisis, debido al uso de agua o soluciones contaminadas para "limpiar" los filtros y reutilizarlos (14, 85).



Otra infección frecuente es la de piel y huesos; ésta suele localizarse en los sitios de inyección y tiene su origen en el empleo de soluciones contaminadas. Entre los microorganismos involucrados figuran *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. chelonae* y *M. kansasii* y, en el caso de pacientes con SIDA con enfermedad diseminada, se ha demostrado que los agentes causales provienen del agua del hospital (85).

Las especies *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. gordonae* y *M. chelonae* han sido aisladas de endocarditis posteriores a cirugías cardíacas y de infecciones en incisiones quirúrgicas; su origen también implica al agua contaminada, pero otra causa consiste en la inadecuada esterilización del equipo quirúrgico. Otros trastornos intrahospitalarios incluyen a la celulitis, infección de la pared abdominal, meningitis, infección espinal y otitis media; dichas patologías aparecen después de ciertos procedimientos quirúrgicos, tales como cirugías dermatológicas, reparación de hernias, toma de biopsias, uso de catéteres peritoneales, inyecciones y cirugías cosméticas, entre las que destacan las rinoplastías, liposucción, mamoplastías de aumento y blefaroplastías (cirugía de párpados) (14, 18, 24, 84).

Las infecciones derivadas del uso de catéteres son muy comunes y se presentan más frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos; el proceso patológico puede afectar al sitio de entrada, al túnel bajo la piel donde está colocado el catéter y/o al torrente circulatorio (bacteremia). Generalmente, el agente etiológico es *M. fortuitum*, aunque también se ha detectado a *M.*

*abscessus*, *M. chelonae*, *M. immunogenum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. smegmatis* y *M. septicum* entre otras especies (14).

### **Otras enfermedades**

*M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* también figuran como agentes causales de otitis media e infecciones corneales, e inclusive, la última de dichas especies llega a ocasionar mastoiditis (14, 85). *M. neoaurum* se ha asociado a enfermedades relacionadas con el uso de catéteres y el abuso de drogas vía intravenosa, pero también se ha sugerido que llega a infectar al sistema nervioso central y producir demencia progresiva (54).

Considerando que las MNT son microorganismos ubicuotas, es necesario establecer una mayor cantidad de estudios epidemiológicos tendientes a profundizar en el conocimiento de las vías de transmisión, a diseñar medidas más eficaces de prevención y a identificar los grupos poblacionales susceptibles a las infecciones ocasionadas por estos microorganismos.

### III. FACTORES DE VIRULENCIA

La detección y caracterización de los mecanismos moleculares asociados a la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por micobacterias no tuberculosas avanza constantemente.

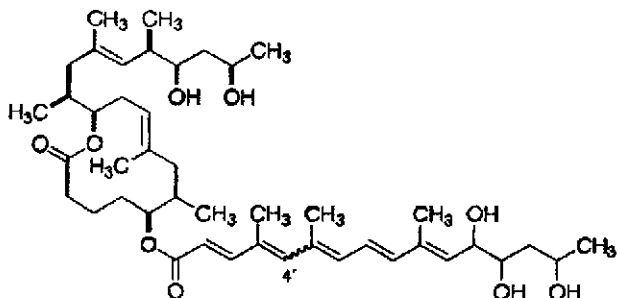
Los hallazgos logrados en esta materia están resultando trascendentales, no sólo para entender los procesos relacionados con la patología, sino también porque se están identificando potenciales "blancos" para la terapéutica; los factores de patogenicidad representan determinantes en la colonización y proliferación micobacteriana en el hospedero, por lo que pueden catalogarse como necesarios para la supervivencia del patógeno y la patogenia de la afección, pero por lo general no aplican para la nutrición.

Entre los factores de virulencia que se han ubicado en las MNT destacan los siguientes:

⇒ **Micolactonas.** Son macrólidos integrantes de una pequeña familia de toxinas lipofílicas y se constituyen por una cadena de policétidos esterificada a un centro de 12 átomos. Las ejemplifican las micolactonas A y B (consultar la Figura 1) y sólo se han detectado en *Mycobacterium ulcerans*, especie en la

que se piensa funge como un factor que promueve la supervivencia en las glándulas salivales de los insectos que habitan en las zonas en donde la úlcera de Buruli es endémica. Las colonias de las cepas que las producen presentan una coloración amarillo pálido, mientras que las de las mutantes micolactona negativa son blancas. Esta clase de compuestos parecen tener actividad citotóxica, analgésica e inmunosupresora, siendo responsables de la ausencia de respuestas inflamatorias en la enfermedad. De acuerdo con modelos *in vivo*, la inyección subcutánea de micolactona purificada reproduce la patología causada por la infección con *M. ulcerans*; de hecho, las variantes micolactona negativa son avirulentas, lo que refuerza las apreciaciones en el sentido de que la toxina desempeña un papel fundamental en la patogénesis (43, 46, 49).

**Figura 1.** Estructura de la micolactona A (isómero z en C-4') y micolactona B (isómero E) (102)



A nivel celular, esta clase de compuestos induce alteraciones en el citoesqueleto, seguidas por un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y, eventualmente, induce la muerte celular vía apoptosis, probablemente mediante la activación de las caspasas. Dado que son moléculas pequeñas e

hidrofóbicas, parecen entrar a la célula mediante difusión pasiva, en lugar de utilizar algún receptor, ya que en los diversos experimentos no se ha logrado observar inhibición competitiva ni saturación. Estudios con fluorescencia han revelado que la micolactona se acumula en el citoplasma, pero no en el núcleo, y que se une lenta e irreversiblemente a un subconjunto de proteínas citoplásmicas (97).

La síntesis de estas moléculas depende de proteínas que están codificadas en un grupo de seis genes, de los cuales tres se expresan para la producción de las policétido sintasas, enzimas importantes en la biosíntesis. Los genes *mIsA1* y *mIsA2* dan origen a las policétido sintasas del anillo central y el *mIsB* a la cadena lateral; dichos genes residen en el plásmido pMUM001, de 174 kb, rico en secuencias de inserción y con importante homología en la mayor parte de sus secuencias, lo que implica cierta inestabilidad y que su evolución ha sido reciente mediante múltiples eventos de recombinación y duplicación (102, 104).

Las secuencias de inserción podrían mediar algunos rearrreglos del plásmido, originando que éste presente diferentes tamaños, y que sus mapas muestren deleciones en diferentes regiones. A pesar de esa variabilidad, se han recuperado micolactonas relativamente homogéneas de las cepas aisladas en diferentes regiones geográficas, lo que sugiere que la toxina también desempeña un papel fundamental en el ambiente, para la colonización y permanencia en las glándulas salivales del insecto y propiciando la formación

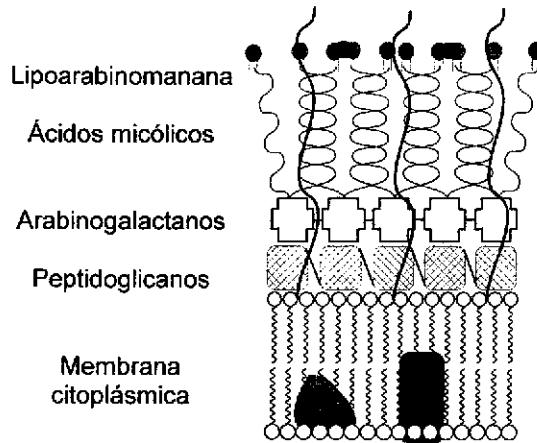
de biopelículas (102). Sin embargo, sí existe heterogeneidad en cuanto a la estructura y citotoxicidad de las micolactonas asociadas a cepas de *M. ulcerans* aisladas en diferentes zonas del mundo, en congruencia con los distintos grados de virulencia y de capacidad de transmisión a humanos (104).

El plásmido pMUM001 posee un *locus* de partición activa que asegura que las células hijas reciban una copia del episoma durante la división celular. Las micolactonas representan el primer ejemplo reportado, tanto de virulencia micobacteriana residente en plásmidos, como de que la transferencia horizontal de genes y la pérdida de éstos son particularmente importantes en la evolución de la patogénesis ligada a las micobacterias (102, 104).

⇒ **La envoltura celular**, actúa como una barrera de permeabilidad para moléculas polares que, además, es resistente a la acción de los ácidos, álcalis y el hipoclorito; en tal contexto, está catalogada como el principal factor de virulencia de las MNT y se constituye por una capa interna integrada por peptidoglicanos (ácido N-glicolilmurámico) y polisacáridos arabinogalactanos, a la cual rodea una capa externa conformada por proteínas, carbohidratos y lípidos (consultar la Figura 2), que al parecer, confieren carga negativa a la superficie bacteriana y actúan como “ligandos” que median la unión a los macrófagos. Entre éstos destacan los ácidos micólicos, que inducen diferentes respuestas por parte del hospedero y que varían entre las distintas especies; además, las moléculas expuestas suelen ser reconocidas por ciertos

receptores celulares, lo que facilita a la bacteria su supervivencia y multiplicación (38, 60, 105).

**Figura 2.** Envoltura celular de las micobacterias.



Los hallazgos anteriores se han logrado utilizando moléculas purificadas, en algunas de las cuales se ha comprobado su relevancia en la interacción micobacteria-células del hospedero. En esta clase de moléculas sobresalen los glicolípidos fenólicos, glicopeptidolípidos, acil trehalosas, dimicolato de trehalosa, poliacil trehalosas, lipooligosacáridos, fosfolípidos, triglicéridos, ácidos micólicos, lipoarabinomananas y fosfatidilinositol manósidos; sin embargo, aún se discute extensamente acerca de su respectiva localización exacta (116).

A continuación se describen las principales características de las más destacadas.

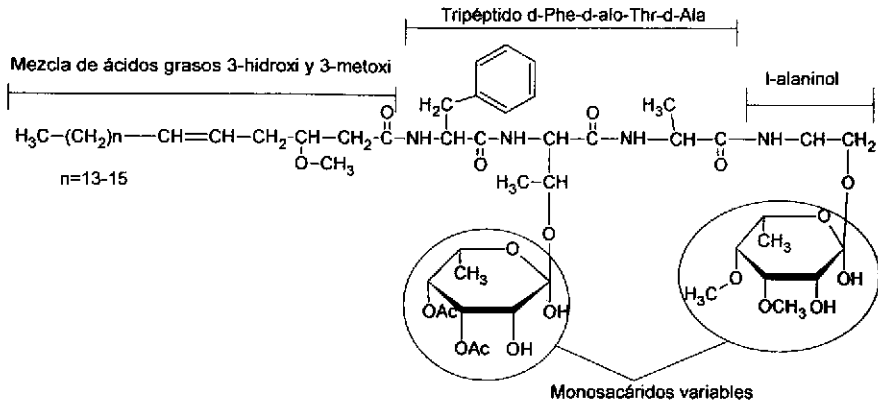
**Glicopeptidolípidos (GPL).** Representan los constituyentes predominantes de la envoltura de numerosas MNT y, aparentemente, son específicos de cada especie. Una forma en la que estos compuestos parecen apoyar la evasión de los mecanismos macrofágicos, es el siguiente: durante el crecimiento intracelular dentro del fagosoma, los GPL se acumulan contribuyendo a la formación de una "cápsula" que rodea y protege a las MNT de la acción de las especies reactivas de oxígeno; sin embargo, no se conoce a fondo la participación de los GPL localizados en partes más internas de la envoltura celular o su contribución a la permeabilidad celular (38, 105). Se les puede dividir como sigue:

*Glicopeptidolípidos lábiles al álcali*, sólo presentes en *M. xenopi*, y

*Glicopeptidolípidos tipo C*, presentes en micobacterias saprófitas (*M. smegmatis*), en patógenos oportunistas para el humano (*M. avium intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) y en los que infectan a animales (*M. paratuberculosis*, *M. porcinum*, *M. senegalense*). No se han detectado en *M. tuberculosis* y *M. kansasii*, son estables en álcalis, están compuestos por un núcleo lipopeptidil (consultar la Figura 3), difieren en cuanto a su número y naturaleza de monosacáridos unidos al grupo hidroxilo de  $\alpha$ -Thr y/o alaninol, y pueden variar en el número y patrón de acetilación y metilación, por lo que muestran diferentes propiedades cromatográficas y antigénicas (38, 60, 116).



**Figura 3.** Estructura del núcleo peptidil común de los GPL tipo C de las micobacterias (38).



Los GPL tipo C son responsables de la variación antigénica, factor importante en la evasión de la respuesta inmune, pero su participación en la patogénesis aún no se ha establecido con más claridad; en un estudio se observó que son de las moléculas más activas que actúan impidiendo la interacción bacilo-macrófago, pero también se ha sugerido su participación en la internalización micobacteriana, planteándose que sus glicoconjugados cuentan con receptores en la superficie de los macrófagos. En un experimento se emplearon mutantes incapaces de producir GPL tipo C, revelándose que si bien esa ausencia no afecta la capacidad de internalización, sí altera la cinética de su proceso, el cual es más rápido; los autores consideran, consecuentemente, que los GPL pueden enmascarar a los verdaderos "ligandos" micobacterianos que interactúan eficazmente con los receptores situados en la superficie macrófaga o que, en su defecto, el grado de hidrofobia en la superficie celular influye en el tiempo de internalización bacteriana. Los receptores del macrófago a los cuales se podría estar

impidiendo la interacción incluyen a los de manosa (MR) y a los del complemento (CR). En este estudio, también se observó que la ausencia de GPL tipo C produce un aumento de la hidrofobia, afectando la permeabilidad de la envoltura celular y la morfología colonial (38,116).

**Lipomanana (LMs) y lipoarabinomanana (LAMs).** Son lipoglicanos complejos que abundan en la pared celular y desempeñan una función muy interesante que facilitaría la supervivencia de las micobacterias a la respuesta inmune del hospedero: interactúa con diferentes células del hospedero y regulan la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, inhiben la actividad microbicida de los macrófagos e impiden la proliferación de los linfocitos T (115).

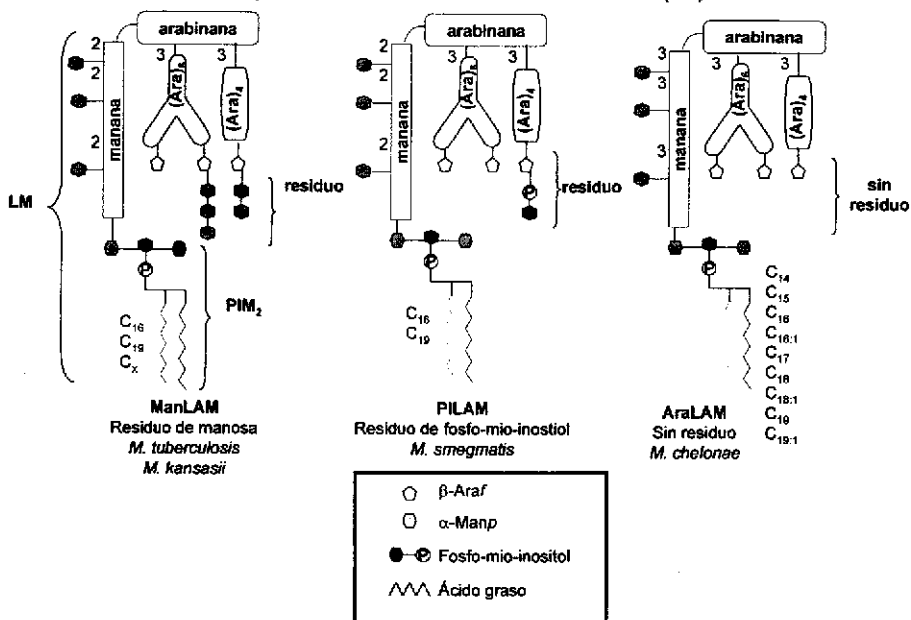
Las LAMs se han aislado a partir de especies de crecimiento rápido y de *M. smegmatis*. Sus propiedades dependen de sus respectivas características estructurales y se constituyen por tres dominios estructurales: uno es el fosfatidil-*mio*-inositol y a éste se unen los 2 restantes: un centro de D-manana y un dominio terminal de D-arabinana que puede tener un residuo manosil o fosfoinositol (28).

Se dividen en tres tipos: a) los manosilados (ManLAMs), que se caracterizan por tener oligosacáridos de manosa y se encuentran en especies patógenas tales como *M. avium* y *M. kansasii*; b) los que poseen fosfoinositol (PILAM), que se han aislado de especies no patógenas como *M. smegmatis*, otras MCR

no identificadas (*Mycobacterium sp*) y *M. fortuitum*; y c) los que no presentan ningún residuo (AraLAM), como los detectados en *M. chelonae* (consultar la Figura 4) (13, 28, 50, 71, 115).

Todos estos glicolípidos son heterogéneos en cuanto a sus patrones de acilación y la ramificación de sus dominios de arabinana y manana (115).

**Figura 4.** Estructuras de las tres familias representativas de las moléculas LAM (28).



Las diversas formas de LAMs han sido implicadas en un amplio rango de funciones biológicas, incluyendo la inhibición de la proliferación de los linfocitos T, la de la actividad microbicida de los macrófagos y la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (EROS) (50). Por tal motivo, se suelen clasificar como modulinas, por su capacidad de manipular al sistema inmune

del hospedero, lo que desencadena múltiples vías de señalización que controlan la apoptosis y la producción de IL-12 por parte de los macrófagos y las células dendríticas (28).

Se ha demostrado que, en ambas células del hospedero, los receptores tipo toll (TLR), especialmente los TLR2 y TLR4, son esenciales para reconocer a los diferentes componentes de la pared celular micobacteriana y, posteriormente, activar los factores que inician la transcripción de los genes que codifican para diversas citocinas pro-inflamatorias. Así, el CD14 asociado al TLR2 ha sido descrito como receptor de la PILAM la cual, como también ocurre con la LM, es una potente inductora de la producción de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-12 y de la propia apoptosis, debido probablemente a su residuo de fosfoinositol. También se ha observado que la LM, pero no la LAM, induce la activación de macrófagos, caracterizada por la expresión de CD40 y CD86, así como por la secreción de NO $\cdot$  (13, 28, 71, 115).

La ManLAM es considerada como una molécula anti-inflamatoria que, al unirse al receptor de manosa (MR) o al DC-SIGN (receptor específico de lectina tipo-C en las células dendríticas), provoca las respuestas que se mencionan a continuación permitiendo a la bacteria sobrevivir dentro de los macrófagos (13, 28, 46, 50, 64, 71, 115):

- ♣ Disminución de la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  por macrófagos y células dendríticas estimulados por lipopolisacáridos.
- ♣ Inhibición de la respuesta del IFN- $\gamma$ .
- ♣ Prevención de la maduración de las células dendríticas.
- ♣ Inducción de la producción de IL-10.
- ♣ No inducción de la apoptosis.

De acuerdo con ello, las enzimas que participarían en la síntesis de la LAM –a partir del núcleo de LM–, serían determinantes para la virulencia de las micobacterias.

Se ha sugerido que las ManLAM inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma; como es bien sabido, los lisosomas de los fagocitos profesionales poseen bajo pH y contienen diversas enzimas líticas que actúan sobre las bacterias o parásitos que han sido fagocitados por el macrófago, de manera que la inhibición de la fusión es crucial para la supervivencia intracelular. El mecanismo que se ha propuesto para explicar esta inhibición, involucra la interrupción de la liberación de Ca<sup>2+</sup> por una vía diferente a la del inositol trifosfato, afectando la maduración del fagosoma al no aumentar la cantidad de fosfoinositol-3-fosfato en las membranas, el cual es requerido para el reclutamiento del péptido EEA1 (early endosomal antigen 1) y éste a su vez, para el de marcadores intracelulares como la sintaxina 6 y catepsina D. Al afectar la liberación de Ca<sup>2+</sup>, también se impide la fosforilación del residuo

S727 de Stat1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1), lo cual es un evento crítico en la activación del gen que codifica para el IFN- $\gamma$ , una citocina proinflamatoria (13).

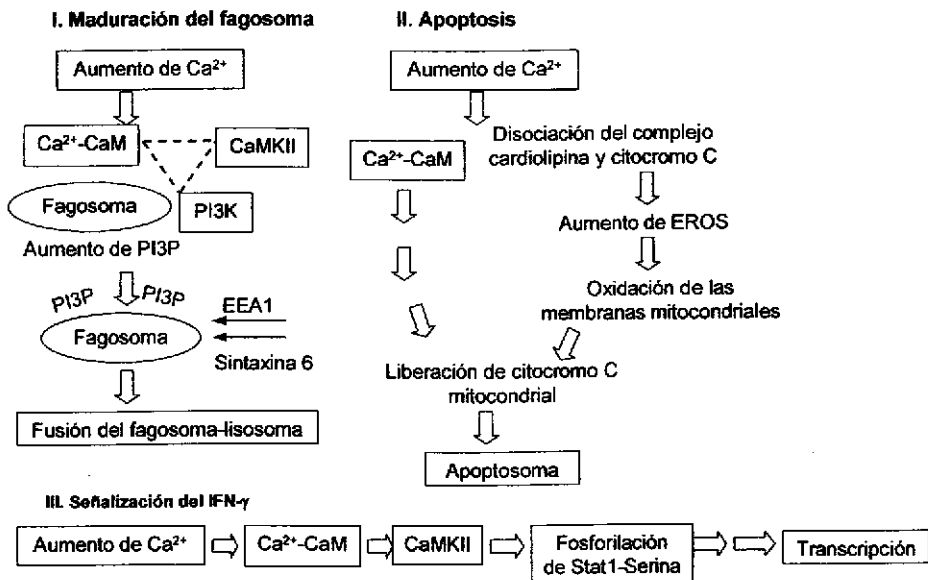
Recientemente, se ha reconocido la regulación de la apoptosis debido a que el flujo de calcio aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, provocando la liberación de citocromo C al citosol, y por lo tanto la formación del apoptosoma, cuyas caspasas activadas actúan sobre proteínas y ADN. Así, es posible la existencia de un vínculo entre la capacidad de la ManLAM para inhibir la apoptosis y la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el macrófago (13).

Finalmente, es posible que ManLAM también afecte la señalización de diversas vías promoviendo la supervivencia de la célula o bien inhibiendo la respuesta ocasionada por el IFN- $\gamma$  (13). En resumen, las vías de señalización afectadas por la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  se muestran en la figura 5.

Se ha visto que ManLAM también es secretado *in vivo* por macrófagos infectados, lo que indica que las micobacterias pueden secretarlo para interferir la acción de las lectinas tipo-C producidas por las células dendríticas y macrófagos, que son capturadas e internadas por los patógenos y que según estudios recientes podrían influenciar la respuesta inmune a través de señalizaciones cruzadas con TLR; asimismo, varios patógenos que se unen a DC-SIGN y su homólogo L-SIGN (expresado por células endoteliales en los

nódulos linfoides e hígado), pueden escapar al sistema inmune e inhibir las funciones celulares de las células dendríticas. La unión a L-SIGN puede explicarse porque el patógeno es rápidamente internado a los lisosomas, lo que favorece su eliminación; sin embargo, también resulta posible favorecer la invasión de los tejidos donde se encuentran estos receptores (64).

**Figura 5.** Efectos del aumento de  $Ca^{2+}$  en la maduración del fagosoma, apoptosis y la señalización del  $IFN-\gamma$  en los macrófagos (13).



En el caso de las LMs, se ha observado que el grado de manosilación modula los efectos inductores en la producción de citocinas, por lo que al tener arabinana (LAMs) se previene la producción de citocinas, esto último se atribuye a que el dominio de arabinana produce impedimento para que interactúe el dominio de manana (115).

Dado que los LMs y LAMs coexisten en la pared celular de las micobacterias, la proporción en la que se encuentren podría ser importante para su capacidad de modular la respuesta inmune y la apoptosis, influenciando el inicio de la infección (28).

**Ácidos micólicos.** Éstos representan un tercio (masa seca) de la envoltura celular y corresponden a cadenas de ácidos grasos de alto peso molecular esterificados a los arabinogalactanos de la pared celular. Su estructura general es  $R-CH(OH)-CH(R')-COOH$ , donde R es una cadena de meromicolato formada por 50 a 60 carbonos y R' una cadena alifática con 22 a 26 carbonos. Dichos compuestos confieren al microorganismo una gran resistencia contra el daño químico, baja permeabilidad a diversos antibióticos y a sustratos hidrofílicos, así como resistencia a la deshidratación. Los cambios de temperatura, pHs bajos y solventes orgánicos pueden modificar la proporción existente entre sus ácidos grasos saturados e insaturados, e inducir la isomerización cis-trans y la ciclopropanación, lo que puede ayudar a mantener la fluidez de la membrana y su impermeabilidad (45).

Las modificaciones estructurales del meromicolato son inducidas por una familia de metiltransferasas, y son importantes para la impermeabilidad de la pared celular y la virulencia. En las cepas patógenas, dichos cambios también pueden ser producidos por la expresión de genes que introducen grupos ciclopropilo en posiciones relativamente conservadas de la cadena de meromicolato; por ejemplo, la sintasa codificada por el gen *mmA2* coloca un



ciclopropano en posición distal, aumentando la resistencia de *M. smegmatis* al daño oxidativo, mientras que, cuando aquel es insertado en la posición proximal, lo que se incrementa es la impermeabilidad (21, 45).

Cuando la bacteria crece dentro de los macrófagos y el tejido pulmonar, la cantidad de cetomicolatos empieza a ser mayor, lo que sugiere que esta clase de micolatos es importante para la supervivencia micobacteriana durante la infección (45).

Sin embargo, aún no se ha logrado establecer cómo afecta su composición a la función de la pared celular, aunque se sabe que en una mutante de *M. smegmatis* que acumula meromicolatos incompletos, aumentan notablemente la permeabilidad y la fluidez de la pared (45).

Los genes *kasA* y *kasB* son fundamentales para la elongación de los micolatos. El primero codifica para una enzima que cataliza la extensión inicial de las cadenas de micolatos, por su parte, *KasB* permite alcanzar el tamaño total, lo que se traduce en cierta longitud de la cadena de ácidos grasos para conferirle permeabilidad a la pared celular y disminuir la susceptibilidad micobacteriana, a los mecanismos de inmunidad innatos, tales como la lisozima y las defensinas (péptidos antimicrobianos presentes en distintos tipos celulares, incluidos los neutrófilos y macrófagos), y a las moléculas pequeñas e hidrofóbicas tales como diversos antibióticos. Estudios recientes

con *M. marinum* revelan que *kasB* aparenta participar en el establecimiento de la infección e impide la eficaz fusión fagolisosomal (45, 99).

**Glicanos.** Son los componentes predominantes de una capa en la envoltura celular de las micobacterias que simula una cápsula y suelen contener residuos de glucosa, manosa o arabinosa. Estos compuestos podrían estar involucrados en las interacciones iniciales de las MNT con los macrófagos y neutrófilos, e inclusive, en ausencia de opsoninas reducen la captura del bacilo por parte de los fagocitos profesionales (105).

Cabe señalar que el grosor de la capa de glicanos también resulta importante para la supervivencia micobacteriana dentro de las células del hospedero y que su producción está considerada entre los factores a través de los cuales el microorganismo llega a “controlar” el sitio anatómico de la infección (105).

**2,3-Di-O-aciltrehalosa (DAT).** Corresponde a un glicolípido localizado en la capa exterior de la envoltura celular cuya estructura está formada por dos cadenas de ácidos grasos y dos  $\alpha$ -glucosas. En virtud de que no se encuentra unido covalentemente a los peptidoglicanos, puede interactuar con las células del hospedero y hasta insertarse en la membrana de estas últimas, alterando su funcionamiento global, se trate de células fagocíticas o no fagocíticas. En *M. fortuitum* se ha encontrado que estos residuos pueden generar una respuesta humoral, además de inhibir la proliferación de linfocitos T por

mitógenos, fenómeno ajeno a algún efecto tóxico sobre la célula o a blastogénesis. Así mismo, se ha observado que entre más cortas son las cadenas de ácidos grasos, dicho efecto inmunomodulador aumenta (90).

Algunos otros glicolípidos prácticamente suprimen la función de los linfocitos T, afectando tanto a las células T citotóxicas como a las presentadoras de antígeno; los mecanismos implicados incluyen la interferencia de la presentación y la liberación de factores inhibidores tales como la PGE-2. Se ha sugerido que los efectos inmunomoduladores de los glicolípidos son inespecíficos y pueden relacionarse con daños en la membrana de las células del sistema inmune, vía su inserción en ella (90).

⇒ **Fosfolipasas.** Las fosfolipasas manifiestan un amplio espectro de efectos *in vivo* e *in vitro*, los cuales incluyen desde alteraciones menores en la composición de la membrana celular hasta fenómenos letales. Estas enzimas se dividen en los siguientes cuatro grupos, dependiendo de la posición del enlace que hidrolizan en la molécula de sustrato: A1, A2, C y D. Las que han demostrado tener una participación importante en la patogénesis de las micobacteriosis son la C y la D, aunque ésta ha sido detectada tanto en especies virulentas como en las saprófitas (88, 99).

La fosfolipasa C (PlcC) es un factor de virulencia importante, también presente en otras bacterias, incluyendo a *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*. Su actividad se ha

reportado C en extractos de MNT patógenas tales como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. ulcerans* y *M. marinum*, resultando probable que participe en la degradación de la membrana del fagosoma o modificando su permeabilidad, además de modular la respuesta inmune al activar la cascada del ácido araquidónico, lo cual interfiere la transducción de señales en las células infectadas. Su expresión aumenta en los macrófagos, por lo que tal vez desempeñe un papel relevante en la infección del hospedero, proporcionando nutrientes a la bacteria; los ácidos grasos pueden representar una importante fuente de carbono y energía, merced a la  $\beta$ -oxidación y la vía del glioxilato (47, 88, 99).

Diversos estudios han demostrado que las fosfolipasas pueden ocasionar hemólisis al hidrolizar la fosfatidilcolina y la esfingomielinea aunque, de hecho, también actúan sobre los fosfolípidos de membrana generando diacilglicerol; lo anterior podría considerarse como un efecto adicional en la patogénesis de las infecciones por micobacterias, si bien sólo algunos autores señalan esta posibilidad, puesto que se ha observado que una hemólisis débil induce la producción intensa de NO $\cdot$  haciendo a la micobacteria más susceptible a los efectos bactericidas de los macrófagos; y la hemólisis intensa aumenta la producción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos infectados (47).

En los estudios correspondientes, todas las cepas productoras de fosfolipasa C fueron hemolíticas; sin embargo, es preciso señalar que algunas cepas

fosfolipasa C negativa, tales como *M. fortuitum*, también evidenciaron actividad hemolítica, lo que se puede explicar fácilmente aludiendo a la posible presencia de hemolisinas no proteicas: se ha demostrado claramente la actividad hemolítica extracelular después de haberse agregado proteinasas o previo calentamiento (47).

⇒ **Adherencia, supervivencia y replicación dentro de macrófagos.** Las micobacterias patógenas difieren de las no virulentas en cuanto a que interaccionan e invaden las células del hospedero con mayor eficacia, debido a la hidrofobia de su superficie celular y a que pueden habilitar diversos receptores o moléculas de adhesión presentes en la superficie "blanco", además de que al desarrollarse intracelularmente cuentan con mecanismos que les permiten obtener los nutrientes necesarios en el interior de la célula infectada (5, 25, 37, 49, 119).

Utilizando como modelo cepas de *M. marinum* (especie cercana genéticamente a *M. tuberculosis*), se han logrado identificar dos loci, denominados *mel1* y *mel2*, los cuales aumentan la capacidad bacteriana para infectar macrófagos. Ambos están constituidos por 11 genes y codifican para componentes membranales o de secreción (*mel1*) y para lípidos involucrados en la adherencia e ingreso a las células del hospedero (*mel2*). Además, es probable la existencia de dos transglutaminasas o cisteinproteasas en *mel1*, lo que resulta muy interesante debido a que las primeras pueden participar en la transducción de señales originadas en las células eucariontes y en la

adherencia bacteriana a diversos receptores. Por su parte, el *loci mel2* sólo se encuentra en ciertas micobacterias, sugiriendo algún papel en la patogénesis, y sus genes parecen estar relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos y policétidos (37).

En *M. avium* se ha identificado una proteína con una secuencia de aminoácidos similar a la de la HbhA (hemaglutinina de unión a heparina) de *M. tuberculosis*. Ambas proteínas se unen al componente C3 del complemento y su carga positiva le permite reaccionar con moléculas de carga negativa situadas sobre la superficie de los macrófagos. Se une a glicoconjugados sulfatados como la heparina, pero no a fibronectina, galactosa o manosa, y podría mediar la adherencia a la célula "blanco" y a los componentes de la matriz extracelular, e inclusive, participaría en la internalización de la micobacteria a las células del hospedero (77).

Las investigaciones sobre la generación y mantenimiento del fagosoma, así como acerca de las moléculas que regulan su tráfico, han revelado que la patogenicidad de las micobacterias está muy ligada a su capacidad para sobrevivir dentro de los macrófagos. Normalmente, los microorganismos fagocitados son degradados después de que los lisosomas se fusionan con el fagosoma que los contiene; sin embargo, las micobacterias viven dentro de éste, sin que ocurra su acidificación ni la fusión fagolisosomal (25).

Se ha visto que la captura de *M. avium* por parte de los monocitos y macrófagos se asocia a la presencia, en la superficie de estos últimos, de integrinas, de los receptores CR3 y CR4, del de vitronectina y del de manosa; aunque el microorganismo también se une a la fibronectina, a través de moléculas tales como el **antígeno 85**, también conocido como proteína de unión a fibronectina y que corresponde a un complejo de tres proteínas (antígenos 85A, 85B y 85C), las cuales tienen las siguientes funciones (38, 21, 27):

- ◆ Como micoloiltransferasa (antígeno 85C), transfiriendo cadenas de ácidos micólicos a los derivados de trehalosa, para que funcionen como inmunomoduladores; además, cataliza la síntesis de micolatos unidos a la pared celular para mantener la permeabilidad y fluidez de la envoltura celular.
  
- ◆ Se unen a la fibronectina para inducir la internalización de la micobacteria por parte de los macrófagos, a través de fagocitosis mediada por complemento.

La bacteria manipula la señalización del hospedero, creando un microambiente adecuado para su supervivencia y desarrollo dentro del macrófago, al margen de que el patógeno es resistente a los mecanismos oxidativos del fagocito. La generación del microambiente apropiado para las MNT puede deberse a que, en el macrófago, se activan promotores después

de 24 ó 48 h, asociados a diversas actividades biológicas, entre las que destacan (5, 27):

- ✓ la síntesis de nucleótidos (*guaB3*, *corA*)
- ✓ replicación del ADN (*dnaZX*)
- ✓ síntesis de policétidos (*pks7*)
- ✓ traducción y modificación de proteínas (*infB*, *greA*)
- ✓ metabolismo (*nirB*)
- ✓ degradación de macromoléculas (*lipL*)

Esa activación de los promotores también puede desencadenar algún rearrreglo de la envoltura celular, aunque no puede descartarse que el ambiente fagosomal ejerza cierta influencia sobre la expresión de los genes de virulencia, o bien, que promueva la supresión de la expresión de algunos genes del macrófago (27, 49, 118).

Por otro lado, es claro que la virulencia micobacteriana depende de muchos otros factores; por ejemplo, de la capacidad de la célula bacteriana para incrementar su expresión del receptor para transferrina, necesario para su procuración de hierro. Como es bien sabido, dicho metal es fundamental para la vida microbiana, ya que resulta indispensable para la síntesis de citocromos, forma parte del centro activo de numerosas enzimas y es un regulador de los genes de virulencia en la bacteria. Las principales moléculas de transporte de hierro en las micobacterias son los **sideróforos**, agentes



quelantes que compiten por el hierro con el fagocito profesional, aún en el interior del fagosoma (49, 118).

Las micobacterias producen dos clases de sideróforos: las micobactinas y las exoquelinas; las primeras son derivados del ácido salicílico que contienen una hidroxianiloxazolina y dos N-hidroxiamidas, todas las cuales conforman un sitio de gran afinidad hacia el hierro. En realidad existen diversas micobactinas con diferentes sustituyentes alquilo y acilo en el centro de la molécula, pudiéndose dividir en dos grupos según su solubilidad (22, 26):

- Las *lipofílicas* exhiben una cadena de ácidos grasos (C10 a C20) con un doble enlace (comúnmente en C2).
  
- Las *hidrofílicas*, también denominadas carboximicobactinas o exomicobactinas, son excretadas al medio para que se unan al metal y lo transfieran al interior de la célula bacteriana vía las micobactinas asociadas a la pared celular.

El intenso estudio de esta clase de moléculas ha permitido observar que las deleciones o reemplazos en los genes encargados de la síntesis de micobactinas afectan el crecimiento dentro de los macrófagos (26).

Cabe señalar que sólo en las micobacterias patógenas se ha logrado encontrar a las micobactinas hidrosolubles y que, en las saprófitas, los

principales sideróforos son las exoquelinas, catalogadas como péptidos hidroxamatos, extracelulares e hidrofílicos; y cuyo proceso de transporte requiere energía y un receptor, siendo similar al mecanismo presente en *Escherichia coli* (22, 26).

Las micobacterias patógenas y las saprófitas cuentan con sistemas de transporte de hierro, pero solo en las primeras se ha confirmado un aumento de la concentración de hierro dentro de las primeras 24 h después de la fagocitosis y al existir una disminución del metal en el medio; también se ha detectado un incremento en la expresión de otros genes que codifican para otras proteínas de unión, como el *fecB*, cuyo producto puede estar involucrado en el transporte de hierro en forma de citrato, indicando la posible existencia de otros mecanismos que permiten a la bacteria continuar con su crecimiento y supervivencia (118, 119).

⇒ ***Inhibición de la formación del fagolisosoma.*** Normalmente, una bacteria es internalizada a los fagocitos dentro de vesículas denominadas fagosomas, las cuales progresivamente se acidifican y se fusionan con los lisosomas, dando lugar a estructuras conocidas como fagolisosomas o lisosomas secundarios; para que ello ocurra, el fagosoma debe adquirir componentes específicos de superficie como Rab5 (GTPasa que regula la fusión de membranas del endosoma temprano) y los fosfoinosítoles que, junto con Rab5, reclutan numerosos efectores, entre los que destaca el antígeno del endosoma temprano 1, que permiten el acoplamiento y fusión membranales

(65). Después, el fagosoma pierde estos marcadores y adquiere otros, como Rab7 y glicoproteínas lisosomales asociadas a membrana, los cuales median la fusión con los lisosomas (3).

En contraparte, las micobacterias impiden la fusión fagosoma-lisosoma y pueden crecer dentro del macrófago. A tal respecto, se afirma que interfieren el reciclaje de las proteínas Rab (evitando la adquisición de marcadores del endosoma tardío), retienen a las proteínas de unión a actina coronín 1 (conocidas como TACO o P57 y cuya participación se ha comprobado en la organización del citoesqueleto y la fusión de vesículas) y desorganizan la red de filamentos de actina encargados de dar dirección al endosoma hacia su "sitio blanco". Además, a pesar de que no se forma el fagolisosoma, se han observado interacciones entre el fagosoma y el endosoma, con lo que la bacteria puede adquirir transferrina y otros nutrientes esenciales para su crecimiento intracelular (5, 3, 37).

Otros mecanismos que inhiben la maduración del fagosoma en fagolisosoma, incluyen (5, 25, 27, 49, 120):

- Inhibición de la transcripción y la actividad de enzimas lisosomales proteolíticas –como la catepsina D– que son marcadores lisosomales, o aumento de la expresión de  $\alpha$ 1 antitripsina.

- ☑ Evitar la acidificación de las vacuolas que contienen a la micobacteria en el interior del macrófago al impedir la expresión de la H<sup>+</sup>-ATPasa, que actúa como bomba de protones, en la superficie de la vacuola.
  
- ☑ Algunos lípidos interfieren el tráfico de proteínas provenientes del complejo de Golgi, o bien, inhiben la respuesta producida por IFN- $\gamma$ .
  
- ☑ Activación de genes específicos que permiten a las micobacterias sobrevivir dentro del fagolisosoma.

Se piensa que las **serín/treonín proteín cinasas** (Pkn) tienen una participación importante en la supervivencia de la micobacteria dentro del macrófago, así como en la inhibición de la fusión con los lisosomas, aunque su función aún no está clara (120).

Entre las cinasas más estudiadas destaca la PknG, la cual no presenta dominios transmembranales, se localiza en el citoplasma y está codificada por el gen *pknG*. En este contexto, se ha observado que las micobacterias no patogénicas no expresan la PknG, por lo que la formación del fagolisosoma ocurre rápidamente y mueren por efecto de los compuestos bactericidas presentes; por el contrario, las patógenas expresan la enzima, tardan una hora en ser internalizadas en el macrófago, pueden proliferar en su interior y se evita la fusión del fagosoma con el lisosoma (120).

La modulación de la fusión fagosoma-lisosoma por parte de la PknG podría ocurrir vía la fosforilación de las proteínas del fagocito; en todo caso, los experimentos han demostrado un claro incremento en la secreción de la enzima después de que la micobacteria ha sido internalizada (120).

Algunos estudios revelan que las Pkn que permiten la supervivencia de las micobacterias, son similares a las de los eucariontes y son producto de la co-evolución entre micobacterias y células hospederas. Resulta interesante haber encontrado genes de cinasas de eucariontes en diversos genomas bacterianos, aunque en la mayoría de los procariontes, su expresión se ha perdido porque no son necesarios para el crecimiento de la bacteria, por lo que el hecho de encontrarlas en las micobacterias patógenas es un indicio de la importancia que tienen estas enzimas para su virulencia (120).

La supervivencia de las micobacterias dentro del fagosoma también se ha asociado a la expresión del gen *mig*; éste codifica para una **acil-coenzima A** involucrada en la activación de los ácidos grasos libres, para que sean degradados por la  $\beta$ -oxidación o funjan como intermediarios en la síntesis de ácidos grasos más largos, lipoproteínas o glicolípidos. La  $\beta$ -oxidación puede estar relacionada con la biosíntesis de glucosa a través de la vía del glioxilato, lo que también sustentaría la supervivencia de la bacteria dentro del macrófago, merced a la presencia de enzimas tales como la isocitrato liasa y la malato sintasa, de la vía del glioxilato (21). Considerando que los ácidos

grasos pueden ser precursores de algunos efectores en la respuesta inmune, también es posible que la enzima en un principio ayude a detoxificar a través de la unión con la coenzima A y la subsecuente  $\beta$ -oxidación (76).

⇒ **Escape del fagosoma.** A pesar de la similitud existente entre las micobacterias patógenas, se ha logrado establecer que sólo algunas cepas de *M. marinum* son capaces de escapar del fagosoma y liberarse hacia el citoplasma; además, lo que sorprende es su comportamiento posterior análogo al de *Shigella sp* y *Listeria monocytogenes*: adsorbe colas de actina de la membrana fagosómica durante el escape y adquiere movilidad mediante la polimerización-despolimerización de dicha proteína contráctil, tal como si se tratara de una cometa. Ello propicia su propagación hacia otras células, intercelularmente, sin entrar en contacto con el medio extracelular; esta característica parece guardar alguna relación con la capacidad de producir hemólisis y, aparentemente, los genes que inducen la polimerización de la actina sólo son activados durante la infección, para consolidarla y diseminarla (99).

⇒ **Formación de granulomas.** Las especies del MAC y *M. marinum* pueden causar infecciones persistentes dando lugar a lesiones conocidas como granulomas, en las cuales se mantiene un número estable de bacterias. Los granulomas están integrados por macrófagos evolucionados a células epitelioides y algunas otras células del sistema inmune que son reclutadas.

Los experimentos muestran que, en el interior de los granulomas, se expresa la mayoría de los genes que también lo hacen en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano, por lo que es posible que la bacteria haya entrado en un equilibrio dinámico con el sistema inmune del hospedero. Así mismo, se ha observado que otros genes sólo se manifiestan durante la permanencia micobacteriana en el granuloma, conduciendo a la producción de proteínas involucradas en la respuesta a condiciones de estrés, entre las cuales destacan las serín/treonín proteín cinasas (20).

⇒ ***Productos de genes micobacterianos que responden a la oxidación.***

Uno de los mecanismos bactericidas que aplican los macrófagos en contra de los agentes invasores se relaciona con la elaboración y/o liberación de EROS, destacando el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ). Por tal motivo, la supervivencia microbiana dentro del macrófago depende de su resistencia a esas EROS, la cual reside en enzimas que las modifican o degradan, tales como el complejo catalasas-peroxidasas + superóxido dismutasa, también eficaces en cuanto a su participación en la resistencia a isoniazida (5).

**Catalasa-peroxidasa.** La catalasa descompone al  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, igual que sucede con la peroxidasa, aunque esta última acopla el oxígeno naciente a algún compuesto orgánico que termina siendo oxidado; ambas utilizan al grupo heme como cofactor. Las micobacterias producen enzimas de las dos clases, entre las que destacan las siguientes (consultar la Tabla 1) (5):

- ✓ **KatG (catalasa T).** Esta enzima es inducible, termolábil, miembro de las hiperperoxidasas tipo I (HPI), posee actividad de catalasa-peroxidasa y es resistente a aminotriazol.
  
- ✓ **KatE (catalasa M).** Esta catalasa-peroxidasa es termoestable, no inducible, pertenece al grupo HP11 y es sensible a aminotriazol.
  
- ✓ **Catalasa (catalasa A).** Descrita en cepas de *M. avium* y *M. intracellulare*, es similar a la catalasa KatE HP11, pero con mayor resistencia a altas temperaturas y más hidrofóbica.
  
- ✓ **Alquilhidroperoxidasa (AhpC).** Es una enzima inducible que protege a la bacteria de los peróxidos, especialmente en ausencia de KatG.

**Superóxido dismutasa (SOD).** Cataliza la dismutación del radical superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y oxígeno, asociándose a hierro, cobre-zinc o manganeso. *M. smegmatis* produce una SOD con manganeso, mientras que, los patrones de inhibición de la actividad de la enzima en *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum*, sugieren que presentan hierro y manganeso; es oportuno mencionar que dichos estudios fueron realizados con extractos crudos y no con la enzima purificada. Por otra parte, el gen *sodA* de *M. avium*, codifica para una SOD de 23 kDa, conformada por 207 aminoácidos con gran similitud a la de *M. tuberculosis* y *M. leprae* y es exportada en grandes cantidades al medio extracelular (5).



**Tabla 1.** Catalasa-peroxidadas y superóxido dismutasas presentes en micobacterias no tuberculosas (5).

Especie	Catalasa-peroxidasa		SOD	Otras
	HPI	HPII		
<i>M. asiaticum</i>	KatG	KatE	No detectada	No detectada
<i>M. aurum</i>	No detectada	KatE	No detectada	No detectada
<i>M. avium</i>	KatG	KatE	SOD	No detectada
<i>M. intracellulare</i>	KatG	KatE	SOD	AhpC
<i>M. gordonae</i>	KatG	KatE	No detectada	No detectada
<i>M. kansasii</i>	KatG	KatE	No detectada	No detectada
<i>M. phlei</i>	No detectada	No detectada	SOD	No detectada
<i>M. scrofulaceum</i>	KatG	KatE	No detectada	No detectada
<i>M. smegmatis</i>	KatG	No detectada	SOD	No detectada
<i>M. terrae</i>	No detectada	KatE	No detectada	No detectada
<i>M. xenopi</i>	KatG	No detectada	No detectada	No detectada

Estos tipos de enzimas se consideran relevantes factores de virulencia ya que, una vez que las bacterias han sido engullidas por los fagocitos profesionales, son expuestas a EROS y especies reactivas de nitrógeno (ERN) producidas por estos últimos. En tal sentido, al menos las EROS son neutralizadas por ellas, lo que representa una gran posibilidad de supervivencia intracelular para las micobacterias. Evidentemente, es de esperarse que existan otros factores decisivos para que se logre la residencia intracelular de las micobacterias, incluidos la permeabilidad u otros sistemas enzimáticos; por el momento, se tienen reportes confusos en cuanto a la susceptibilidad de las cepas que presentan mutaciones en alguno de los genes de las catalasa-peroxidadas y de la SOD (5).

Por otro lado, más que las EROS, las ERN, entre las que destaca el óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), han sido identificadas como responsables de la muerte de las micobacterias dentro de los macrófagos alveolares; a este respecto, es

conveniente considerar que se ha demostrado que la KatG de *M. tuberculosis* presenta actividad de oxinitratasa, lo que podría neutralizar a dichos compuestos nitrogenados, y que numerosas cepas catalasa positiva son sensibles a las ERN, por lo que es posible que existan otros sistemas de detoxificación, como el reportado en *M. fortuitum*, consistente en la expresión del gen *noxR1* cuyo producto aparenta conferir resistencia a las ERN; inclusive, se han detectado mecanismos asociados a algunos componentes de la pared celular, los cuales no interactúan con receptores en los macrófagos, lo que disminuye la inducción de la producción de NO<sup>•</sup> por parte de esta célula eucarionte (73).

⇒ **Proteínas.** En numerosas bacterias patógenas se ha evidenciado la capacidad de translocar proteínas efectoras hacia las células hospederas con el objeto de sobrevivir. Algunas de las moléculas proteicas en cuestión son las siguientes:

**Proteínas ESAT-6** ("blanco" antigénico de excreción temprana; 6 kDa) y **CFP-10**. Ambas están codificadas por la región de diferencia 1 (RD1), su ausencia en *M. marinum* se ha asociado a un crecimiento defectuoso dentro del macrófago y se piensa que son requeridas para la citólisis y la invasión de los tejidos del hospedero (99). En modelos experimentales, la RD1 promueve la muerte de los macrófagos y su agregación, lo que favorece la diseminación de la bacteria al contar con más sitios en donde crecer (117).

**Proteínas PE-PGRS.** Los miembros de la familia PE se caracterizan por presentar un *motif* de prolina y ácido glutámico muy conservado en el extremo amino terminal; las proteínas PE-PGRS tienen el dominio PE y en el extremo carboxilo terminal evidencian repeticiones cíclicas de Gly-Gly-Ala o Gly-Gly-Asn codificadas por las PGRS (polymorphic GC-rich repetitive sequences). Las secuencias que codifican estas proteínas se han identificado, en cantidad variable, en todos los genomas de micobacterias que han sido estudiados, por ejemplo en *M. marinum* hay aproximadamente de 80 a 140 genes de PE-PGRS, mientras en *M. avium* y *M. smegmatis* menos de 10 genes (25).

Si bien sus funciones se desconocen, se sabe que se activan una vez dentro del macrófago y se especula que inhiben la presentación del antígeno o que promueven la variación antigénica *in vivo*, con lo que las micobacterias pueden evadir la respuesta inmune; diversos autores también sugieren que las proteínas PE-PGRS participan en eventos de adhesión celular favoreciendo la interacción con los macrófagos (12, 25). Estudios realizados en *M. marinum* muestran que se localizan en la superficie de la bacteria y que las cepas con mutaciones en los genes que las codifican no crecen dentro de éstos ni persisten en los granulomas (99).

**Proteínas de choque térmico (Hsp).** Estas proteínas desencadenan alguna respuesta tendiente a la supervivencia de las células –microbianas u hospederas– expuestas a incrementos repentinos de temperatura o a condiciones de estrés, la inducción de su expresión permite mantener la

integridad celular, contribuye a la señalización de la respuesta inmune y al reconocimiento del patógeno. En el hospedero, las Hsp participan como moléculas chaperonas favoreciendo la presentación por MHC I, por lo que la expresión constitutiva o sobre-expresión de las Hsp bacterianas reducen su supervivencia; así una alteración parcial en la regulación de estas proteínas impacta en la virulencia: disminuye la capacidad para establecer una infección crónica, ya que dichas moléculas resultan necesarias para la supervivencia dentro del fagocito (101).

**Proteína exportadora de repetición (erp).** Presenta tres dominios: el amino terminal está altamente conservado e incluye una señal de secuencia, la región central es variable y tiene repeticiones del *motif* PGLTS, y el dominio C-terminal es conservado y rico en prolina y alanina. Originalmente, se consideraba como un factor de virulencia exclusivo del complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*; sin embargo, se ha demostrado que se trata de una proteína extracelular producida por especies patógenas y saprófitas (*M. smegmatis*). De hecho, se ha detectado en *M. avium*, *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. paratuberculosis* y *M. ulcerans*. Observaciones efectuadas en mutaciones que implican al gen *erp*, incluyen una morfología colonial diferente —por lo que es posible que la proteína contribuya a mantener la estructura de la pared celular—, así como la incapacidad para establecer una infección exitosa *in vitro* e *in vivo* (30).

⇒ **Fotocromogenicidad.** En el caso de *M. marinum*, el pigmento amarillo de tipo carotenoide que sintetiza al reproducirse exponiéndose a la luz, le confiere resistencia al daño foto-oxidativo eliminando el  $^1\text{O}_2$  y las especies dañinas como  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  formadas por la radiación UV. La producción de dicho pigmento es posible merced a los genes *crtB* y *crtI*, cuyas eventuales mutaciones suelen traducirse en incapacidad para sobrevivir intracelularmente y una mayor susceptibilidad al oxígeno singulete (99).

⇒ **Resistencia a las condiciones ácidas.** La infección de *M. avium* en los pacientes con SIDA ocurre principalmente a través del intestino, lo que demuestra que la bacteria resiste las condiciones ácidas del estómago (10).

De hecho, se ha observado que, independientemente de la fase de crecimiento, *M. avium* resiste la exposición a un pH de 2 y que su viabilidad sólo disminuye significativamente cuando la incubación bajo dichas condiciones se prolonga hasta las 24 h. Evidentemente, en el fenómeno inciden muy diversos factores; por ejemplo, las bacterias en fase estacionaria incubadas durante un día son más tolerantes al ácido, debido posiblemente a la regulación positiva de la expresión del gen *sigE*: la proteína resultante ( $\sigma^E$ ) es integrante de una familia de moléculas responsables del reconocimiento del promotor y de la regulación de otros genes; es inducida por condiciones de estrés y se ha observado que las mutantes defectuosas disminuyen la capacidad para crecer dentro del macrófago y para interferir la respuesta

inmune; adicionalmente, modula a genes que codifican para proteínas y enzimas involucradas en la síntesis y degradación de ácidos grasos (10, 72).

Es importante mencionar que *M. avium* no requiere adaptarse previamente a las condiciones de acidez, tal como se ha descrito para *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, ello quizá se deba a que la pared celular de la micobacteria no necesita sintetizar *di novo* a las proteínas, lípidos y carbohidratos implicados en la resistencia, e inclusive, podría ocurrir que su protección provenga de la producción e incorporación de glutamato tal como lo hace *Escherichia coli* (10).

⇒ **Resistencia a fármacos.** La mayoría de las micobacterias son resistentes a alguno de los agentes terapéuticos utilizados normalmente como antimicobacterianos y su susceptibilidad varía entre los diferentes miembros del grupo. La prevalencia y extensión de la resistencia está aumentando, convirtiéndose en un problema serio que dificulta el tratamiento de las enfermedades que producen. Los fármacos como la claritromicina, azitromicina, rifabutina, etambutol, amikacina, clofazamina y fluoroquinolonas, que son efectivas en los aislamientos primarios, pierden efectividad a menos de que sean administrados en combinación (100, 123).

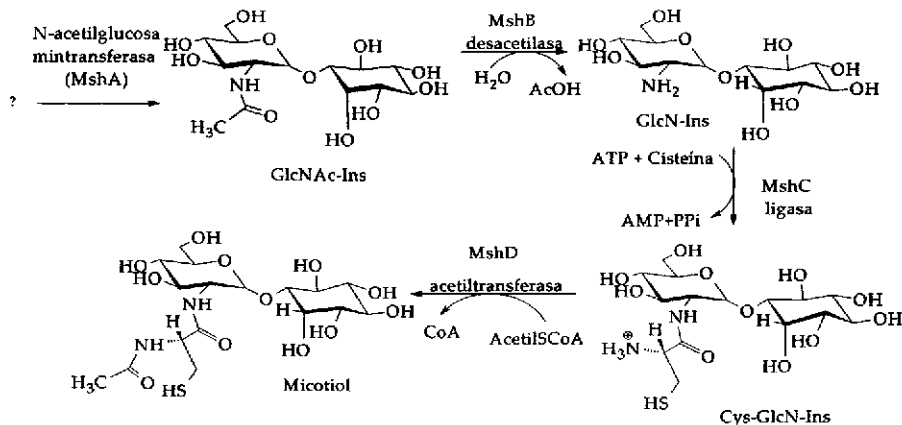
La resistencia intrínseca de las micobacterias es una propiedad causada por la baja permeabilidad que los ácidos micólicos dan a la pared celular, aunque

también están involucrados otros factores como el eflujo y la inactivación enzimática (68, 100).

A continuación se describen brevemente los aspectos asociados a los mecanismos de resistencia a varios fármacos.

Los **micotoles** de la envoltura celular consisten en una N-acetil-L-cisteína unida a un pseudodisacárido, d-glucosamina y mio-inositol; se biosintetizan a través de cuatro pasos (consultar la Figura 6) y desempeñan funciones relacionadas con un sistema de detoxificación para ayudar a la bacteria a sobrevivir en condiciones de estrés oxidativo y por antibióticos (87).

**Figura 6. Ruta biosintética del micotiol (87, 80).**

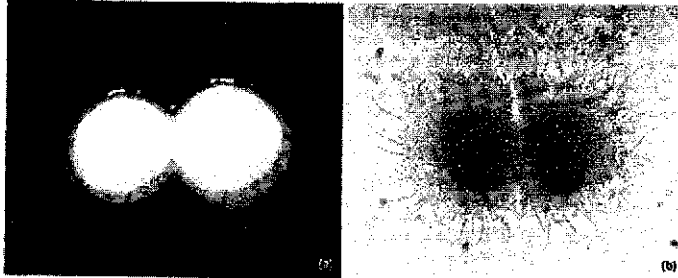


Las mutantes que carecen de micotoles son más susceptibles a diversos agentes oxidantes y alquilantes como diamida, hidroperóxido de cumeno, nitrofurantoina, plumbagina y yodoacetamida. Los patrones de susceptibilidad

a estos agentes y antibióticos varían en cepas con mutaciones en alguna de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los micotoles, lo que se ha atribuido a la regulación o activación de otros sistemas enzimáticos (87).

La susceptibilidad a los antibióticos puede variar en colonias de la misma especie debido a las diferencias en la morfología, esto se ha observado en *M. celatum* y micobacterias del complejo *M. avium-intracellulare* al utilizar rifampicina, isoniazida y pirazinamida. Las colonias pueden ser lisas opacas y lisas transparentes (consultar la Figura 7), siendo éstas últimas más virulentas al multiplicarse fácilmente en el interior del fagocito, mientras las opacas forman filamentos que rápidamente invaden y destruyen al macrófago (42).

**Figura 7.** (a) Colonias lisas opacas observadas en microscopio estereoscópico. (b) Colonias lisas transparentes observadas con microscopio *invertido* (42).



Durante la infección con una variante opaca se forman colonias intermedias transparentes-opacas, lo que es indicativo de la selección del fenotipo transparente para mantener la infección. Los factores que ocasionan el cambio en la morfología no se conocen (42).



El **eflujo** fue identificado en las micobacterias desde 1996, es un mecanismo que produce la disminución en la acumulación intracelular de un fármaco a través de transportadores de diversas familias como la ABC (casete de unión a ATP) y MFS (superfamilia principal de transportadores facilitadores). El estudio de estos transportadores se ha dificultado por la obtención de mutantes deficientes en su expresión, por lo que sus funciones deben ser esenciales para la célula (68).

Diversos estudios demuestran que la bomba de eflujo LfrA participa en la resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclinas e isoniazida; y la proteína codificada por el gen *emrE* produce un aumento en la resistencia a fluoroquinolonas. También se han identificado deleciones en homólogos del gen Rv1877 de *M. tuberculosis*, que hacen a las cepas susceptibles a eritromicina, tetraciclina y kanamicina, pero no a fluoroquinolonas (68).

En la resistencia a fluoroquinolonas participan otros factores además del aumento en la expresión de los transportadores de eflujo, tales como alteraciones en los genes *gyrA* y *gyrB* de la girasa del DNA, la única topoisomerasa tipo II de las micobacterias; estos cambios son sustituciones en las regiones que determinan la resistencia a quinolonas (QRDRs) en las subunidades A y B de la enzima. Estas mutaciones son detectadas para complementar las pruebas de susceptibilidad (29, 75, 100).

El pentapéptido codificado por el gen *mfpA* no ha sido identificado como bomba de eflujo, pero su expresión o mutaciones que la favorezcan, incrementa notablemente la resistencia a fluoroquinolonas, probablemente por interacciones hidrofóbicas con estas moléculas. Junto con otras proteínas homólogas, es posible que protejan a la micobacteria de sustancias producidas por otras bacterias, plantas o incluso por ellas mismas, aunque no se cuenta con evidencia que apoye la hipótesis (75).

La capa externa puede ser atravesada por dos vías: la hidrofóbica, caracterizada por la naturaleza de las interacciones con la membrana, y la hidrofílica (o porinas) cuyas propiedades están determinadas por las proteínas del canal. En *M. smegmatis* se han identificado diversas porinas: MspA - principal vía de difusión-, MspB, MspC y MspD. En *M. chelonae*, *M. phlei* y *M. fortuitum* se han localizado porinas similares a MspA. Las porinas están involucradas en el transporte de antibióticos y las cepas mutantes deficientes en éstas son resistentes a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprim (81, 100).

La resistencia a fármacos como la vancomicina, rifampicina y eritromicina se debe a que son excluidos por su hidrofobicidad y su tamaño molecular les impide el paso a través de la porina, cuyo diámetro es de 1 nm. Las deleciones en el gen *mspA* aumentan notablemente el nivel de resistencia a los fármacos mencionados (81, 100).

La resistencia a D-cicloserina se ha asociado a la sobreproducción de las enzimas "blanco": D-alanina racemasa (Alr) y D-alanina:D-alanina ligasa (Ddl), las cuales participan en la biosíntesis de peptidoglicanos. En el caso de que sólo se sobre-exprese el gen *ddl* la resistencia es menor (43).

En el caso de los macrólidos, la resistencia es común en muchas MCR como *M. fortuitum*, *M. smegmatis* y *M. mageritense*. Comúnmente es ocasionada por alteraciones en nucleótidos del ARNr 23S, pero existe otro factor involucrado: la presencia del gen *erm*, que produce una metilasa que transfiere uno o dos grupos metilo a una adenina en la región de la peptidiltransferasa del ARNr 23S, la metilación en ese sitio ocasiona que el ribosoma se una en menor grado a este grupo de fármacos. Cabe señalar que la metilasa del gen *erm* también confiere resistencia cruzada a lincosamida y estreptogramina B; aunque ésta de igual forma se debe a la expresión de bombas de eflujo, como *mefA* y *msrA*, y enzimas que inactivan los fármacos (79).

El mecanismo de resistencia a rifampicina no es muy conocido, en la mayoría de los casos se han identificado mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa –"sitio blanco" de la rifampicina-, aunque es posible que exista otro mecanismo, dado que se han encontrado cepas de *M. kansasii* resistentes sin alguna mutación en el gen mencionado. Se debe

hacer notar que las cepas con alta resistencia tampoco son susceptibles a otras rifamicinas como la rifabutina (63).

La resistencia a etionamida es causada por la sobre-producción de la proteína EthR, un represor autorregulado de la expresión de la enzima EthA, flavin monooxigenasa que activa a la etionamida (87).

La resistencia a linezólido ha sido asociada principalmente a mutaciones ribosomales que ocurren en el operón *rm* del ARNr, específicamente es una mutación puntual (2447G→U) en el ARNr 23S, sitio catalítico involucrado en la formación del enlace peptídico; aunque al tener muchas copias del operón, una sola mutación no ocasiona resistencia (92).

La isoniazida es muy efectiva en contra de *M. tuberculosis*, aunque es casi 100 veces menos activa en cepas de *M. avium*. Se piensa que la KatG necesita H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para convertir la isoniazida a su forma activa y ésta inhibe la enoíl ACP reductasa, pero al existir mutaciones en los genes de la catalasa-peroxidasa KatG o una segunda enzima que elimine el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la isoniazida no puede ser activada. Lo anterior lo demuestran estudios en *M. avium*, donde la resistencia intrínseca a isoniazida se debe a la presencia de una segunda catalasa que interfiere con la actividad del fármaco y algo similar sucede en cepas resistentes de *M. smegmatis*, en las que se ha detectado la actividad de la alquilhidroperoxidasa (AhpC) (5).

También se ha identificado que las mutaciones en los genes de enzimas participantes en la síntesis de ácidos micólicos confieren resistencia a isoniazida, tal es el caso de las alteraciones en el gen *inhA* de la enoil ACP reductasa, que en *M. smegmatis*, además, confiere resistencia a etionamida (5, 87).

#### IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico inicial de las enfermedades por micobacterias está basado en datos clínicos, y para que sea definitivo, se debe realizar la detección directa e identificación de la especie en el laboratorio clínico (98).

Algunas de las estrategias utilizadas para la identificación de las especies del género *Mycobacterium*, incluyen la observación de las propiedades tintoriales, morfología colonial, pruebas bioquímicas y en pocas ocasiones, la inoculación en animales susceptibles para observar la patogenicidad. Sin embargo, al reconocer otras especies de micobacterias como agentes infecciosos, ha sido necesario contar con criterios adicionales de identificación (16).

Es oportuno recordar que el aislamiento, identificación y pruebas de susceptibilidad a fármacos de las micobacterias de importancia clínica, demora muchas semanas al utilizar las técnicas tradicionales, por lo que en los últimos años se han desarrollado métodos para reducir los tiempos de diagnóstico de semanas a días (98).

Una vez recolectada la muestra, el procedimiento de diagnóstico usual involucra su descontaminación y digestión, la examinación microscópica en

búsqueda de bacilos ácido resistentes (BAAR), el aislamiento del microorganismo a través de su cultivo, identificación y realización de pruebas de susceptibilidad a fármacos (98).

**Muestra.** Un diagnóstico exitoso depende de la calidad de la muestra recolectada, las técnicas de transporte, procesamiento y cultivo. Si es posible, la muestra debe ser tomada directamente de las lesiones u órganos afectados, por lo que se obtiene a través de biopsias y procedimientos como lavados gástricos o broncoalveolares. También pueden recolectarse orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, sangre, materia fecal y pus. Particularmente, en el caso de los pacientes con SIDA o inmunocomprometidos, se han obtenido buenos resultados con muestras de sangre periférica o médula ósea (44, 51, 62).

Debido a que la mayoría de las muestras pueden contener microorganismos que proliferan rápidamente e impedirían el desarrollo de las micobacterias en un medio de cultivo, es recomendable que la muestra se refrigere si su análisis se retrasara y antes de procesarla debe descontaminarse (44, 51).

Lamentablemente, no existe un método ideal para la descontaminación y digestión de las muestras. Dado que las MNT son más sensibles a agentes como hidróxido de sodio (NaOH), la descontaminación tiene que ser más suave (62). Para las muestras contaminadas con flora habitual, se utiliza N-acetil-L-cisteína para favorecer la liberación de los microorganismos de la

mucina o células (licuefacción) e NaOH al 1-2% como descontaminante, posteriormente se recuperan las micobacterias por centrifugación a  $\geq 3000g$ . Para la descontaminación también se utiliza ácido oxálico, el cual resulta muy útil si las muestras contienen bacilos Gram negativos, en particular *Pseudomonas* y *Proteus*. Si la muestra proviene de sitios normalmente estériles puede procesarse sin descontaminar (44, 98).

**Examinación histopatológica.** Este procedimiento ha resultado muy útil en las infecciones por MAC para demostrar la existencia de granulomas en muestras de aspirados o biopsias de médula ósea, hígado o nódulos linfáticos (62).

**Cultivo.** Para optimizar la recuperación de las MNT a través del cultivo, se requiere una combinación de distintos medios, por lo menos se deben utilizar uno sólido y uno líquido. La mayoría de las MNT crecen en los medios comúnmente utilizados como el Kirchner, Löwenstein-Jensen, Middlebrook (7H9, 7H10 y 7H11) y agar o caldo Dubos, aunque es necesario mencionar los siguientes requerimientos especiales que tienen algunas especies: *M. haemophilum* necesita fierro, el cual puede suplementarse con citrato amónico férrico, hemina (factor X), o bien obtenerse a partir de medios con sangre como el agar chocolate. Por su parte, *M. gevanense* y *M. paratuberculosis* necesitan que el medio esté enriquecido con micobactina J (51, 121).



El cultivo tiene una sensibilidad de 80-85%, permite detectar hasta 10 bacterias/mL, su especificidad es del 98% y pueden utilizarse medios sólidos o líquidos. La mayoría de las especies crecen muy lento, pero al utilizar medios líquidos se disminuye el tiempo de detección a 1 ó 3 semanas; sin embargo, los medios sólidos –que necesitan de 3 a 8 semanas de incubación– son necesarios para algunas especies que no crecen en medios líquidos, como *M. haemophilum* (51, 98).

Los componentes más frecuentes en los medios son: ácidos grasos, albúmina, glicerol, huevo coagulado, harina de papa, hidrolizado de caseína, dextrosa, etc. Para aumentar su selectividad, pueden contener colorantes como verde de malaquita o agentes inhibitorios a los cuales *Mycobacterium* es resistente: polimixina, ácido nalidíxico, lincomicina, anfotericina B o cicloheximida (44).

Frecuentemente se utiliza el sistema radiométrico de medio líquido BACTEC porque permite detectar el crecimiento micobacteriano en poco tiempo. Consta de un caldo con palmitato marcado con  $^{14}\text{C}$  como única fuente de carbono, al ser metabolizado por la bacteria se produce  $^{14}\text{CO}_2$ , cuya radiactividad es detectada con el instrumento BACTEC, el cual transforma la información en un índice de crecimiento. A pesar de que se han desarrollado otros métodos, el BACTEC 460 –el primer sistema que se utilizó– sigue siendo el más rápido y sensible, pero se debe tener en consideración el manejo de los desechos radiactivos (121).

Los cultivos deben incubarse en una atmósfera con 5 a 10% de CO<sub>2</sub> y humedad elevada. La temperatura de incubación varía entre las especies de micobacterias, por ejemplo: *M. ulcerans* y *M. marinum* requieren 30°C; la mayoría de las micobacterias patógenas crecen a 35°C y *M. xenopi* lo hace a 45°C, de manera que la temperatura se seleccionará de acuerdo al microorganismo del que se sospeche (62).

**Microscopía.** El análisis microscópico de un cultivo sólido o líquido sirve para hacer un diagnóstico presuntivo y una estimación cuantitativa que permita establecer el estado de la infección, aunque no es posible distinguir entre especies. Para lograr la observación de las micobacterias es necesario hacer uso de algunas técnicas de tinción. En el laboratorio se utilizan tradicionalmente tres tipos de tinciones para la detección de BAAR: Ziehl-Neelsen, Kinyoun y fluorocromo (44, 51, 121).

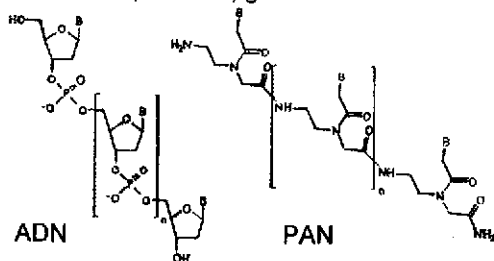
Es probable que los ácidos micólicos de la pared celular de las micobacterias formen complejos con los colorantes básicos que se utilizan en las tinciones y contribuyan con la ácido-alcohol resistencia, característica que el género *Mycobacterium* comparte parcialmente con *Legionella micdadei* y algunas especies de *Nocardia* y *Rhodococcus* (44).

La tinción con carbolfucsina (Ziehl-Neelsen) es la técnica bacilosκόpica más empleada en el laboratorio clínico y requiere que las extensiones se calienten para que el colorante penetre mejor en la pared celular. Posteriormente se

decolora la extensión con alcohol ácido para detectar la presencia de BAAR. El método de la tinción de Kinyoun es similar al de la tinción de Ziehl-Neelsen, pero sin calentamiento. Utilizando la tinción de Ziehl-Neelsen se tiene una sensibilidad de  $5 \times 10^3$  BAAR/mL, aunque algunos autores sugieren que puede aumentar con la concentración de la muestra; sin embargo hay quienes exponen lo contrario y lo atribuyen a que no todas las micobacterias sedimentan por la centrifugación. La tinción con fluorocromo (rodamina-auramina) es más sensible que las convencionales con carbolfucsina y el tiempo de examinación de una muestra puede reducirse, pero una desventaja es que muchas MCR pueden no aparecer fluorescentes (44, 121).

La baja sensibilidad de los métodos de tinción tradicionales ha favorecido el uso de la hibridación in situ fluorescente (FISH), la cual utiliza péptidos de ácidos nucleicos (PANs), moléculas parecidas al ADN en las que se ha sustituido el azúcar fosfatado por una poliamida (por lo que no tienen carga negativa), tienen flexibilidad conformacional y se unen a una secuencia específica de ADN o ARN estableciendo una interacción más fuerte que la de ADN-ADN (consultar la Figura 8). La naturaleza hidrofóbica de los PANs permite que atraviesen fácilmente la pared celular. El PAN es marcado con isotiocianato de fluoresceína, permitiendo la detección de la unión con un microscopio de fluorescencia. En las pruebas comerciales los oligómeros PAN (15 oligonucleótidos) están diseñados para unirse a la secuencia del ARNr 16S ó 23S si se trata de una MNT o una del complejo *M. tuberculosis* respectivamente (34, 51, 58, 121).

**Figura 8.** Estructuras químicas de ADN y PAN. El PAN consiste en unidades de N-(2-aminoetil) glicina enlazadas covalentemente a una base (B). B indica adenina, citosina, guanina o timina.



Tomado de Stender, H. *et al* (1999).  
*Journal of Clinical Microbiology* 37(9): 2760-2765

La técnica FISH permite diferenciar entre especies del complejo *M. tuberculosis* y MNT, lo que es útil en los casos de infección con más de una especie, pero aún no se cuentan con las pruebas para identificar a diversas MNT como *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. marinum*, *M. peregrinum* y *M. xenopi* (34, 58, 67).

**Identificación.** Después de la tinción para detectar BAAR, se inoculan los medios de cultivo para evaluar las características fenotípicas de los aislamientos, las cuales permiten identificar la mayoría de las micobacterias de importancia clínica (44).

Las características de desarrollo a considerar incluyen la producción de pigmento, morfología colonial, velocidad y temperatura de desarrollo. En general, las colonias de las MNT son grandes (de 2 a 5 mm de diámetro), con bordes irregulares y de aspecto granular (44).

Una vez que la micobacteria se ha ubicado en un subgrupo preliminar siguiendo la clasificación de Runyon, se siembran las pruebas bioquímicas que permiten su identificación definitiva a nivel de especie o complejo (44).

Dentro de las pruebas bioquímicas que se utilizan con este fin se incluyen: producción de niacina, reducción de nitratos, hidrólisis de tween-80, arilsulfatasa, ureasa, reducción de telurito, sensibilidad a la hidrazida del ácido tiofen-2-carboxílico (TCH), catalasa (cualitativa, cuantitativa, termoesable), pirazinamidasa, tolerancia al NaCl 5%, captura de hierro, benzamidasa, acetamidasa, alantoinasa, nicotinamidasa, succinamidasa y crecimiento en agar MacConkey sin cristal violeta, entre otras (14, 32, 62, 89).

Las tablas 2, 3, 4 y 5 resumen las pruebas bioquímicas para llevar a cabo la identificación de algunas MNT de importancia clínica (14, 44, 57, 70).

Tabla 2. Grupo I. Fotocromógenos

Especie o complejo	Producción de pigmento	Ariilsulfatasa 3 días	Reducción de nitratos	Catalasa		Captura de hierro	NaCl 5%	Ureasa	Producción de niacina
				SC	TE				
<i>M. asiaticum</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>M. marinum</i>	+	-(+ 14 días)	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. simiae</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	+

Especie o complejo	Hidrólisis de Tween 80 (5 días)	Crecimiento en agar MacConkey	Pirazinamidasa (4 días)	Reducción de telurito	Crecimiento en TCH (10 µg/mL)
<i>M. asiaticum</i>	+	±	-	-	+
<i>M. kansasii</i>	+	-	-	±	+
<i>M. marinum</i>	+	-	+	±	+
<i>M. simiae</i>	-	-	±	+	+

NOTA: *M. marinum* crece óptimamente a 30°C.

**Pruebas importantes para la diferenciación:** Reducción de nitratos, catalasa (SC y TE), ureasa, producción de niacina, pirazinamidasa, ariilsulfatasa, hidrólisis de Tween 80.

**CLAVES:** SC = Semicuantitativa; TE = Termoestable 68°C; + = 90% o más de las cepas son positivas; - = 90% o más de las cepas son negativas; ± = 11-20% de las cepas son positivas; ± = 21-79% de la cepas son positivas; Espacios en blanco indican que no se dispone de la información.

Tabla 3. Grupo II. Escotocromógenos

Especie o complejo	Producción de pigmento	Arisulfatasa		Catalasa		NaCl 5%	Captura de hierro	Ureasa	Producción de niacina
		3 días	14 días	SC	TE				
<i>M. gordonae</i>	+	-	±	+	+	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	+	-	±	+	+	-	-	+	-
<i>M. xenopi</i>	+	+	+	+	±	-	-	-	-

Especie o complejo	Reducción de telurito	Hidrólisis de Tween 80		Crecimiento en agar MacConkey	Pirazinamidasa (4 días)	Crecimiento en TCH
		5 días	8 días			
<i>M. gordonae</i>	-	+	-	-	±	+
<i>M. scrofulaceum</i>	±	± <sup>3</sup>	-	-	±	+
<i>M. xenopi</i>	±	-	-	-	±	+

NOTA: *M. xenopi* crece a 45°C

**Pruebas importantes para la diferenciación:** Arisulfatasa, reducción de nitratos, hidrólisis de Tween 80, ureasa, catalasa (SC)

**CLAVES:** SC = Semicuantitativa; TE = Termoestable 68°C; + = 90% o más de las cepas son positivas; - = 90% o más de las cepas son negativas; ± = 11-20% de las cepas son positivas; ± = 21-79% de la cepas son positivas; Espacios en blanco indican que no se dispone de la información. <sup>3</sup> La hidrólisis puede ser positiva a los 10 días.

**Tabla 4. Grupo III. No Fotocromógenos**

Especie o complejo	Reducción de telurito	Hidrólisis de Tween 80 (5 días)	Crecimiento en agar MacConkey	Catalasa		Pirazinamidasa (4 días)	Ureasa	Ariilsulfatasa	
				SC	TE			3 días	14 días
<i>M. terrae</i>	-	+	±	+	+	±	-	±	+
Complejo <i>M. avium</i>	+	-	-	-	±	+	-	-	±
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	±
<i>M. malmoense</i>	+	+	-	-	±	+	-	-	+
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	+	-	±	-	-

NOTA: *M. haemophilum* y *M. ulcerans* crecen óptimamente a 30°C

**Pruebas importantes para la diferenciación:** Catalasa (SC y TE), hidrólisis de Tween 80, crecimiento en agar MacConkey, pirazinamidasa, reducción de telurito, fosfatasa ácida, reducción de nitratos, ariilsulfatasa, ureasa.

**Tabla 5. Grupo IV. Micobacterias de crecimiento rápido**

Especie o complejo	Ureasa	Producción de niacina	Crecimiento en TCH	Hidrólisis de Tween 80 (5 días)	Reducción de telurito	Crecimiento en agar MacConkey	Pirazinamidasa (4 días)	
							3 días	14 días
<i>M. abscessus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>M. chelonae</i>	+	±	-	+	+	+	+	+
<i>M. fortuitum</i>	+	±	-	±	+	+	+	+
<i>M. flavescens</i>	+	-	+	+	±	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	-	+	+	+	-	+	+

**CLAVES:** SC = Semicuantitativa; TE = Termooestable 68°C; + = 90% o más de las cepas son positivas; - = 90% o más de las cepas son negativas; ± = 11-20% de las cepas son positivas; ± = 21-79% de las cepas son positivas; Espacios en blanco indican que no se dispone de la información.



Tabla 5. Grupo IV. *Micobacterias de crecimiento rápido (continuación)*

Especie o complejo	Producción de pigmento	Arisulfatasa 3 días	Reducción de nitratos	Catalasa		Captura de hierro	Utilización de:				NaCl 5%	
				SC	TE		Manitol	Inositol	Citrato	Sorbitol		
Grupo <i>M. chelonae-abscessus</i>												
<i>M. abscessus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. chelonae</i>	-	+	±	+	±	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. immunogenum</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Grupo <i>M. fortuitum</i>												
<i>M. fortuitum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. peregrinum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Complejo <i>M. fortuitum</i> tercera biovariedad												
<i>M. houstonense</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>M. bonickei</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>M. mucogenicum</i>	-	+	±	±	-	+	-	-	-	+	-	-
Grupo <i>M. smegmatis</i>												
<i>M. smegmatis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
<i>M. wolinskyi</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
<i>M. goodii</i>	±	-	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
<i>M. flavescens</i>	+	- (+ 14 días)	+	+	+	±	±	±	±	±	±	+

NOTA: *M. flavescens* y *M. smegmatis* pueden crecer a 45°C.

Pruebas importantes para la diferenciación: Crecimiento en agar MacConkey, arilsulfatasa, reducción de nitratos, catalasa, captura de hierro, utilización de carbohidratos, tolerancia a NaCl 5%, hidrólisis de Tween 80

CLAVES: SC = Semicuantitativa; TE = Termoestable 68°C; + = 90% o más de las cepas son positivas; - = 90% o más de las cepas son negativas; ± = 11-20% de las cepas son positivas; ± = 21-79% de las cepas son positivas; Espacios en blanco indican que no se dispone de la información.

Es importante mencionar que las reacciones bioquímicas pueden variar entre los aislamientos de una misma especie, además requieren mucho tiempo y no son concluyentes para ciertas MCR como *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. immunogenum*, *M. goodii* y *M. fortuitum*; o bien, su interpretación se complica porque ha aumentado el número de especies o su aislamiento no es común (9, 62). Por lo anterior, se ha recomendado como alternativa para la identificación de las MCR el uso de pruebas de utilización de carbohidratos (fructosa, manitol, sorbitol, inositol, galactosa, trehalosa, xilosa, ramnosa, arabinosa), así como estudios moleculares y el análisis de los lípidos de las micobacterias a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y cromatografía en capa fina (CCF) (14, 62).

Recientemente se han desarrollado otras técnicas como la espectroscopía de masa láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-TOF MS), que permite la caracterización fenotípica de las células, lisados o productos bacterianos como lipopolisacáridos y proteínas; ésta se ha propuesto para identificar en el ADN una región de 500 pb del gen que codifica para el ARNr 16S, obteniendo un espectro de masas para cada tipo de micobacteria (67). También se han usado métodos de serotipificación para *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum*; permitiendo asociar algunos serotipos de *M. avium* a las enfermedades en los pacientes con SIDA (62).

Entre los métodos que se utilizan para lograr diferenciaciones más sutiles entre las especies destacan los siguientes:

## ➤ Métodos moleculares

Las técnicas tradicionales antes descritas requieren largos tiempos de espera para obtener resultados, por lo que se ha favorecido el desarrollo de diversos métodos moleculares para la identificación y realización de pruebas de susceptibilidad, permitiendo además la detección de los ácidos nucleicos de las micobacterias directamente de la muestra (98, 121).

Los métodos moleculares ofrecen muchas ventajas en comparación con las técnicas convencionales: los resultados son obtenidos rápidamente, son confiables y reproducibles; aún cuando los cultivos estén contaminados o mezclados pueden ser analizados y los secuenciadores y programas para analizarlos son técnicamente más sencillos y rápidos (98).

En virtud de lo anterior, estas técnicas son utilizadas cada vez más en los laboratorios clínicos. Se han desarrollado pruebas de ácidos nucleicos para detectar en el genoma micobacteriano las secuencias hipervariables de las regiones conservadas, en donde estén presentes deleciones, inserciones o mutaciones puntuales (109). Así mismo, se cuenta con pruebas para identificar los aislamientos a través de la amplificación de un fragmento específico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de técnicas de "fingerprinting" como la electroforesis en gel de campo pulsante, RAPD-PCR arbitrario (polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados al

azar), polimorfismo de ARNr, tipificación de elementos de repetición o inserción, tipificación de plásmidos y polimorfismos de un solo gen (62, 121).

En este contexto, los principales genes o secuencias útiles para la distinción entre especies de micobacterias son (23, 29, 124):

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| → ARNr 16S y el gen que lo codifica | → espaciadores internos que se transcriben (ITS) |
| → <i>hsp65</i>                      | → <i>rpoB</i>                                    |
| → gen de la proteína de 32-kDa      | → <i>dnaJ</i>                                    |
| → <i>sod</i>                        | → <i>gyrB</i>                                    |
| → <i>recA</i>                       | → secuencias de inserción                        |

#### **Pruebas de ácidos nucleicos.**

Los métodos se basan en la hibridación de ADN específico de cada especie con los ácidos nucleicos liberados de la bacteria. Las sondas están marcadas con éster de acridinio y los resultados se miden con un luminómetro. El método puede desarrollarse aproximadamente en 2 h (98).

Actualmente están disponibles pruebas comerciales de ADN (AccuProbe, Gen-Probe Inc.) para la identificación de las especies con mayor importancia clínica como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii* y las del complejo *M. tuberculosis*, aunque es necesario hacer una prueba por separado para cada especie. Desafortunadamente no se cuenta con sondas

para todas las especies patógenas, por lo que deben utilizarse métodos de identificación adicionales.

Estas pruebas han sido evaluadas en la práctica clínica y resultan rápidas, sensibles y específicas (100%) cuando se tienen al menos  $10^3$  organismos presentes, lo que impide su uso directamente en las muestras. Es importante considerar que para *M. kansasii* la especificidad es de 87% y algunos subtipos de esta especie no reaccionan con la sonda del kit. Con frecuencia se han reportado falsos negativos atribuidos a una cantidad de inóculo insuficiente, lisis incompleta o a la variabilidad de la secuencia "blanco", de manera que es necesario repetir el análisis para su verificación (23, 51, 98, 121).

#### **Métodos basados en PCR.**

La PCR ha encontrado aplicación en la detección de patógenos microbianos revolucionando la práctica diagnóstica de enfermedades infecciosas. En general, los métodos consisten en la amplificación del ADN por PCR utilizando iniciadores específicos y la posterior secuenciación de los amplicones obtenidos. El microorganismo es identificado al comparar la secuencia del producto con una secuencia de referencia que se puede consultar en bases de datos como GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank>), RIDOM (<http://www.ridom.de/>) y bibliotecas ribosomales (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), entre otras; aunque se debe tener precaución al utilizarlas porque algunas de éstas -como GenBank- no son

monitoreadas (23, 98). Algunos autores consideran que los resultados de identificación utilizando la secuenciación de productos de PCR son más exactos que los obtenidos por CLAR (23).

Se ha propuesto utilizar solo la PCR sin la secuenciación, aunque es importante hacer notar que a pesar de la alta especificidad, su sensibilidad es significativamente menor a la del cultivo, por lo que para aumentarla se debe realizar un segundo PCR para amplificar nuevamente una determinada secuencia (121).

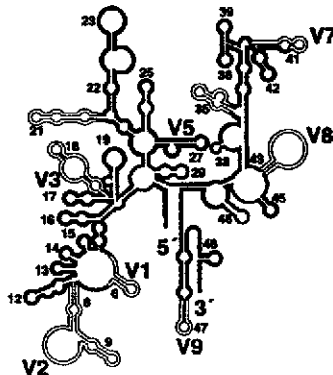
Los métodos basados en la PCR han permitido la detección directa de especies cuyo cultivo en medios convencionales se dificulta, así como la identificación de especies que no habían sido clasificadas (98). Se han desarrollado técnicas con PCR para la rápida identificación de diversas MNT como *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. paratuberculosis* (62).

A continuación se describen brevemente los aspectos asociados a los principales genes y técnicas moleculares que se utilizan para el diagnóstico de enfermedades producidas por MNT.

La secuencia que se emplea comúnmente con propósitos de identificación es la del **ARNr 16S**, la cual también ha permitido el reconocimiento de muchas especies por primera vez. De igual forma, resulta importante la secuencia del gen que lo codifica, conocido como **16S ADNr** (23, 62, 109).

El ARNr 16S está integrado por 1,500 nucleótidos, es codificado por el gen 16S rDNA, éste se encuentra en todas las especies bacterianas y tiene regiones comunes altamente conservadas, así como variaciones que se concentran en áreas específicas. En las micobacterias, los nucleótidos de interés son aquellos que comparten todos los miembros del género *Mycobacterium* y las regiones hipervariables A y B; localizadas en las hélices 8, 9, 10, 11 (región A) y 18 (región B) de la estructura secundaria (consultar la Figura 10). Para propósitos de identificación la región A es suficiente, pero la B puede ser considerada como confirmatoria, aunque en muchos casos su secuencia es compartida por algunas especies o puede variar en pocas bases aún cuando se observen diferencias fenotípicas importantes (98, 109).

**Figura 10.** Modelo de la estructura secundaria del gen 16S ADNr, las líneas dobles indican regiones variables o hipervariables, las líneas negras se refieren a regiones muy conservadas, V1 a V9 señalan las regiones de mayor variabilidad (109).



Para la identificación de las micobacterias en una muestra, se deben considerar las variaciones en el número de copias del gen. Las especies de crecimiento lento tienen solo una, lo que se refleja en su habilidad para la

síntesis de ribosomas e indirectamente en el tiempo de crecimiento; las MCR tienen dos copias, con excepción de *M. chelonae* y *M. abscessus*, quienes tienen varios promotores que aumentan el potencial de síntesis de ribosomas (32, 109).

Cabe mencionar que no es posible diferenciar entre *M. malmoense* y *M. szulgai*, así como *M. abscessus* de *M. chelonae* y *M. marinum* de *M. ulcerans*. Algo similar ocurre con *M. kansasii*, patógeno importante que tiene secuencias idénticas a las de *M. gastri*, una especie no patógena; de manera que para diferenciarlas es necesario secuenciar regiones adicionales o utilizar otras técnicas moleculares como el análisis de los RFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción) (98, 124).

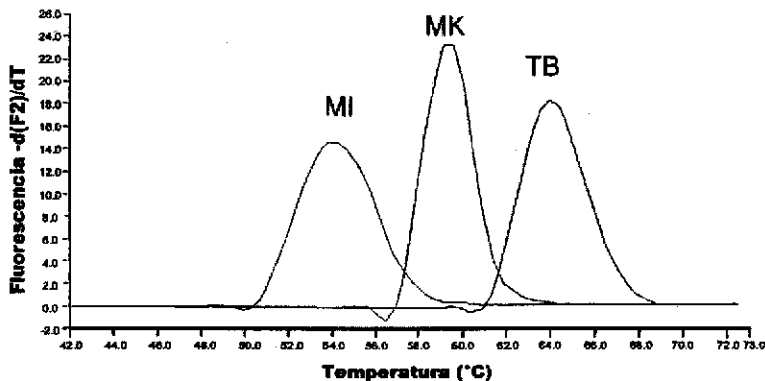
Existen diversas pruebas comerciales basadas en la amplificación del gen del ARNr 16S, entre las que destacan:

◆ AMPLICOR (Roche). Lleva a cabo la hibridación de los productos de PCR (marcados con biotina) con sondas específicas. Posteriormente, se añade peroxidasa de rábano conjugada a avidina, la cual se une a la biotina de los amplicones. El conjugado reacciona con peróxido y 3,3',5,5'-tetrametil benzidina en dimetilformamida para formar un complejo colorido que puede ser medido con un espectrofotómetro. El tiempo aproximado para obtener resultados es de 6.5 h (98).



◆ LightCycler (Roche Diagnostics). Este sistema se basa en la amplificación del ARNr 16S por PCR tiempo real con hibridación fluorogénica, utilizando el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Resulta útil para la detección de micobacterias en muestras clínicas o de cultivos y además realiza el análisis de las curvas de desnaturalización (consultar la Figura 11), lo que permite la diferenciación entre especies cercanas; aunque es importante señalar que las curvas de algunas MNT se enciman, por lo que se debe relacionar los resultados con las manifestaciones clínicas. El método permite obtener resultados rápidos (45 min) porque los cambios de temperatura de la reacción de amplificación se hacen con aire caliente o a temperatura ambiente (65).

**Figura 11.** Curvas de desnaturalización de *M. tuberculosis* (TB), *M. kansasii* (MK) y *M. intracellulare* (MI) (95).



La especificidad de la prueba está dada por oligonucleótidos específicos marcados con dos sustancias que fluorescen por FRET (65). Mientras se incrementa la temperatura lentamente, se monitorea la fluorescencia de dos sondas que previamente se unen a la secuencia de interés, así que la lectura

disminuirá cuando se desnaturalicen. La temperatura de desnaturalización está determinada por diversos factores como la longitud de la sonda, el contenido de GC y el grado de homología entre la sonda y la secuencia "blanco" (65).

El sistema es muy sensible (100%) para diversas especies de MNT como *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum* y MCR, aunque no para *M. gordonae* (95).

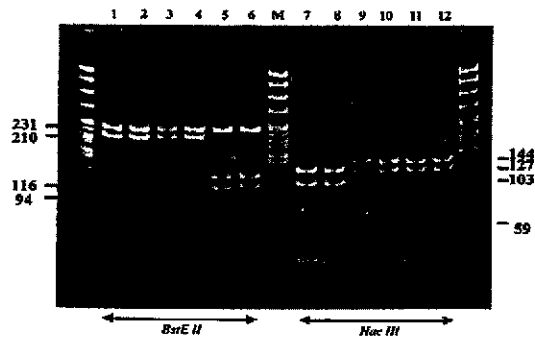
Se debe considerar que este sistema no reemplaza la secuenciación directa, pero puede ayudar a la rápida identificación y diferenciación de las especies de micobacterias si no es posible llevar a cabo la secuenciación (65).

Otro gen útil para la identificación de micobacterias es el de la **proteína de choque térmico de 65-kDa** (*hsp65*), está muy conservado entre las especies de MNT y presenta regiones hipervariables cuyas secuencias pueden ser útiles para la identificación a través del análisis de RFLP, para lo cual se utilizan enzimas de restricción (comúnmente *BstEII* y *HaeIII*) en los productos de amplificación de un fragmento de 441 pb conocido como el fragmento de Telenti. Los productos de digestión son separados con electroforesis en geles de agarosa, presentando un patrón de bandas que es específico de cada especie (consultar la Figura 12). Según algunos autores, permite identificar 34 especies y subespecies de micobacterias, aunque algunas tienen patrones

comunes o bien pueden encontrarse múltiples patrones en una sola especie (109, 121).

Los resultados reportados con este método coinciden en 85.2% con otras técnicas de identificación y las variaciones se presentan frecuentemente con cepas de *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. goodnae*, *M. scrofulaceum* y *M. terrae* (124).

**Figura 12.** Análisis de restricción enzimática. Gel de electroforesis de productos de digestión de los amplificadores de hsp65 de *M. avium* y *M. intracellulare*, utilizando BstEII y HaeIII. Las líneas 1 a 6 tienen los productos utilizando BstEII correspondientes a *M. avium* (1 a 3), MAC (4) y *M. intracellulare* (5 y 6). Las líneas 7 a 12 son los productos de digestión con HaeIII (96).



El análisis de RFLP también puede realizarse con el gen *dnaJ* y el del ARNr 16S, pero requiere de varias digestiones con enzimas y los resultados no son fáciles de interpretar por las pequeñas diferencias en el tamaño de los fragmentos después de la digestión (66).

Los genes de la proteína de 32-kDa y la región de ITS (altamente polimórfica), ubicada entre los genes de los ARN ribosomales 16S y 23S,

también han sido caracterizados con fines de identificación, ya que la diversidad de sus secuencias permite distinguir entre las micobacterias de importancia clínica como *M. avium*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. gastri* y otras micobacterias, con excepción de las que forman el complejo *M. tuberculosis*. (62, 98, 109).

El método de amplificación por PCR que tiene como "blanco" los ITS se basa en las variaciones del tamaño de los amplicones, además de que se puede establecer si la especie es de crecimiento rápido o lento porque tienen dos copias de las regiones ITS (visualizándose como dos bandas) (23). Recientemente, se ha desarrollado una nueva prueba llamada INNO-LIPA Mycobacteria (Innogenetics N.V.), que tiene como "blanco" esta región (124). La prueba permite identificar simultáneamente 16 especies de micobacterias, como las integrantes del complejo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. malmoense* y *M. haemophilum*, aunque no puede diferenciar entre *M. marinum* y *M. ulcerans*. Tiene como ventaja que puede ser utilizado para identificar cultivos viejos o no viables, a diferencia de otros métodos que solo sirven con organismos activos (94, 110). En la prueba se realiza la hibridación reversa de los productos de PCR marcados con biotina en una tira de papel que contiene las sondas de las micobacterias (95). Al adicionar estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina y un sustrato cromógeno, se forma un precipitado púrpura-café en donde hubo hibridación (110).

La sensibilidad reportada es de 100% y su especificidad de 94.4 a 100%, siendo adecuado para la detección y diferenciación de la mayoría de las micobacterias de importancia clínica. Sin embargo, el método no ha resultado completamente satisfactorio, debido al costo y el tiempo que requiere (6 h), por lo que se dificulta su implementación en el laboratorio clínico, de manera que no está disponible en muchos países, ni siquiera en Estados Unidos (94, 95, 110, 122).

La secuenciación del gen *recA* también es una opción al realizar la identificación de las MNT. Se encuentra en todas las micobacterias porque tiene una función importante en la recombinación y reparación del ADN, así como en la respuesta SOS al inducir 20 genes involucrados con la síntesis de ADN y la división celular. Resulta una característica importante que entre las especies su secuencia varía por múltiples sustituciones de nucleótidos en el tercer codón (9).

El análisis del gen de la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (*rpoB*) ha permitido la identificación de diversas micobacterias a través de métodos como hibridación, secuenciación y análisis de polimorfismos, pero las limitadas diferencias entre las secuencias de cada especie lo han dificultado; por ejemplo, en el caso del análisis de restricción esto provoca que en ocasiones sea necesario el uso de más de dos enzimas para diferenciar entre especies, aunque un estudio ha reportado buenos resultados utilizando solo la

enzima *MspI*, y en algunos casos una segunda enzima como *HaeIII*, *Sau3AI* o *HincII* (66).

Un estudio reciente propone la identificación de diversas especies a través de un fragmento de 700-pb del gen *secA1*, que contiene regiones hipervariables y cuyas secuencias muestran muchas sustituciones que originan diferencias en los aminoácidos de la proteína SecA, lo que no ocurre con genes tradicionalmente utilizados como *recA* y *rpoB*; factores que hacen a ese gen un "blanco" adecuado para fines de diagnóstico. Según los autores del estudio, el análisis del gen *secA1*, permite diferenciar entre *M. gastri* y *M. kansasii*, así como *M. abscessus* de *M. chelonae* y *M. marinum* de *M. ulcerans*, pero se deben realizar trabajos con otras especies y evaluar si es posible su uso directamente en las muestras (124).

Entre las **secuencias de inserción** que son amplificadas para la identificación de algunas especies destacan (19, 94, 103):

- IS900. Específica de *M. paratuberculosis*
- IS901/902. Presentes en *M. avium*, *M. paratuberculosis* y *M. silvaticum*
- IS2404. Específica de *M. ulcerans*
- IS2606. Presente en *M. ulcerans* y *M. marinum*
- IS1245. Para *M. avium*
- IS1395. Para *M. xenopi*

Otro método que utiliza técnicas moleculares es la detección directa en tejido embebido en parafina, el cual ha resultado un avance importante en el diagnóstico de enfermedades micobacterianas al ser especialmente útil cuando no se logra su cultivo o el diagnóstico es incierto (14).

#### **Microarreglos de ADN o arreglos de oligonucleótidos de alta densidad.**

Estas técnicas ofrecen la posibilidad de examinar grandes cantidades de secuencias de ADN con una sola hibridación después de llevar a cabo la descontaminación de la muestra, requiriendo un tiempo aproximado de 4 h para obtener resultados. La técnica está basada en la hibridación de nucleótidos de prueba con los amplicones marcados con fluorescencia, emitiendo una señal fluorescente detectada por una cámara. Los nucleótidos de prueba se basan en 82 secuencias únicas del ARNr 16S y 51 secuencias que tienen una sola mutación del gen *rpoB*, permitiendo la discriminación de 54 especies de micobacterias. También pueden usarse oligonucleótidos basados en la secuencia del gen *gyrB* (94, 98).

#### **➤ Análisis de ácidos micólicos.**

Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\beta$ -hidroxilados que tienen cadenas laterales largas en la posición  $\alpha$ , son los mayores componentes de la pared celular de las micobacterias, y difieren en el número de átomos de carbonos

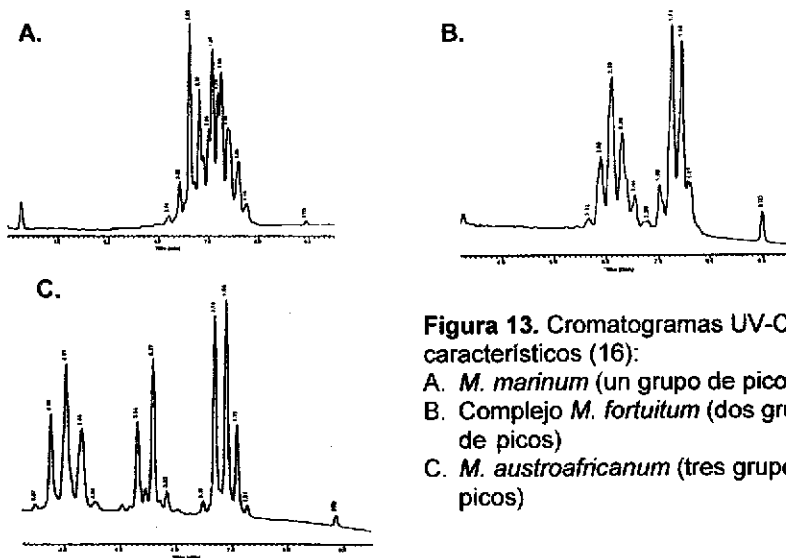
-de 60 a 90-, y por la presencia de grupos funcionales. Generalmente, el patrón de ácidos micólicos varía entre especies, por lo que son utilizados para su identificación en laboratorios de referencia, ya sea a través de CCF, CLAR o con **cromatografía gas-líquido (CGL)** (109).

La CCF permite diferenciar los ésteres de los diferentes tipos de ácidos micólicos: Tipo I ( $\alpha$ -micolatos), tipo II ( $\alpha'$ -micolatos), tipo III (metoximicolatos), tipo IV (cetomicolatos), tipo V (epoximicolatos), tipo VI (ésteres de ceras) y tipo VII ( $\omega$ -1-metoximicolatos). El tipo I está presente en todas las micobacterias, el tipo VII sólo se encuentra en algunas especies de MCR no pigmentadas como *M. senegalense*, *M. alves*, *M. porcinum*, *M. fortuitum* y *M. peregrinum*. Los otros tipos están distribuidos entre las diferentes especies, pero la mayoría de éstas no contienen más de dos o tres tipos de ácidos micólicos, aunque es importante señalar que muchos patrones son compartidos por más de una especie por el limitado número de tipos de ácidos micólicos (109).

El análisis con CCF requiere que los ácidos micólicos sean liberados de la pared celular, son extraídos como micolatos por medio de una metil esterificación, después la muestra se coloca en una placa de sílica gel para que se separen por la acción de una fase móvil. Para identificarlos, se compara el factor de retención (Rf) con el de los ácidos de una cepa de referencia corrido paralelamente (109).



La técnica de CLAR separa los ácidos micólicos en base a su polaridad y la longitud de sus cadenas. Para la identificación, se efectúa la comparación visual del cromatograma con uno obtenido de una especie de referencia. En el cromatograma, el orden de los picos más grandes, el número de grupos de picos (sencillos, dobles, triples o múltiples), sus tiempos de retención y su altura, son información importante, puesto que cada especie está caracterizada por un patrón particular (consultar la Figura 13) (14, 16).



**Figura 13.** Cromatogramas UV-CLAR característicos (16):

- A. *M. marinum* (un grupo de picos)
- B. Complejo *M. fortuitum* (dos grupos de picos)
- C. *M. austroafricanum* (tres grupos de picos)

Para obtener el cromatograma, es necesario liberar los ácidos micólicos a través de saponificación y la extracción con cloroformo, luego se forman derivados como ésteres de bromofenacilo que absorben al UV y aumentan la sensibilidad (16). El extracto es inyectado en una columna de fase reversa, donde se utiliza como fase móvil metanol y cloruro de metileno (109). Como

método de detección se utiliza la absorción al UV a una longitud de onda de 254 a 260 nm. Recientemente se ha aumentado la sensibilidad (de 16 a 26 veces más) a través del marcaje con compuestos fluorescentes (cumarinas), técnica que se conoce como FL-CLAR. El derivado obtenido es excitado a 285 nm y su emisión se registra a 340 nm (14, 16).

La detección usando fluorescencia tiene como ventaja que requiere menor biomasa que el método con UV, pero se necesita una manipulación cuidadosa de la muestra para evitar contaminación cruzada y se debe monitorear que no se arrastren ácidos micólicos de análisis anteriores. Los patrones de las especies de lento crecimiento son estables pero los cromatogramas obtenidos con FL-CLAR de las MCR son comparables con los realizados utilizando la absorción al UV (UV-CLAR), solo bajo condiciones estandarizadas de medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación, puesto que diferentes condiciones de crecimiento pueden causar diversos patrones de ácidos micólicos como respuesta adaptativa y provocar dificultades para la identificación, aunque es importante mencionar que esos cambios parecen ser específicos de cada especie, además se debe considerar que la mayoría de los aislamientos de *M. chelonae*, *M. abscessus* y *M. immunogenum* no pueden ser diferenciados uno de otro. Lo mismo ocurre con las especies de los grupos *M. fortuitum*, el complejo *M. fortuitum* tercera biovariedad y los del grupo *M. smegmatis* (14, 16, 109).

El método puede ser útil para la identificación si se utiliza en conjunto con otras técnicas y bajo condiciones estandarizadas. Aunque una muestra puede procesarse en dos horas, resulta una desventaja que el análisis con UV produzca grandes cantidades de residuos conformados por mezclas de solventes orgánicos como cloroformo, metanol y cloruro de metileno; además de que el equipo necesario es costoso y puede estar fuera del alcance de los laboratorios clínicos (14, 16, 121).

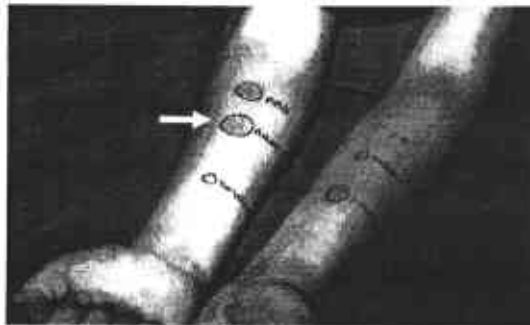
Dentro de las especies de MNT que se pueden identificar por CLAR se encuentran: *M. gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *M. xenopi*, *M. flavescens*, *M. scrofulaceum*, *M. mucogenicum*, *M. gastri*, *M. fallax*, *M. interjectum*, *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. thermoresistibile*, *M. shimoidei*, *M. haemophilum*, *M. gevanense*, *M. malmoense* y *M. szulgai* (16).

Al utilizar CGL, se analizan todos los componentes lipídicos de la pared celular, cuyos productos de pirólisis tienen una distribución que varía cuali y cuantitativamente en las diferentes especies. La temperatura de la columna del cromatógrafo (entre 275 a 300°C), produce la pirólisis de los ácidos micólicos, formando ésteres metílicos saturados con una longitud de 22, 24 ó 26 átomos de carbono ( $C_{22:0}$ ,  $C_{24:0}$  y  $C_{26:0}$ ). Otros productos que son eluidos son ácidos grasos saturados e insaturados derivados de los ésteres de ceras como el hexadecanoico ( $C_{16:0}$ ), octadecanoico ( $C_{18:0}$ ), octadecenoico ( $C_{18:1}$ ), 10-metiloctadecanoico (tuberculoesteárico) y alcoholes secundarios. Para la identificación, los compuestos más importantes incluyen los ácidos grasos

metilados, alcoholes y los ésteres  $C_{22:0}$ ,  $C_{24:0}$  y  $C_{26:0}$ . Los picos con menor altura también son importantes porque muchas especies tienen picos de alturas comunes (109).

**Intradermoreacción (Mantoux diferencial).** Esta reacción inmunológica evalúa la sensibilidad al derivado proteico purificado de *M. tuberculosis* (PPD-T) y al de la MNT, que son inoculados por vía subcutánea en el antebrazo. Los resultados se leen a las 48-72 h al evaluar la aparición de un eritema. Las infecciones por MNT casi siempre dan un resultado fuertemente positivo al derivado de la MNT, con un diámetro mayor a 10 mm de induración (consultar la Figura 9). Frecuentemente los pacientes con una infección por MNT también dan una débil reacción positiva al PPD-T debido a las reacciones cruzadas entre los antígenos; en estos casos, se considera significativo si el diámetro de la induración es al menos 3 mm mayor al de otras induraciones. Si esta diferencia significativa no está presente, la prueba debe repetirse después de 1 a 3 meses (91).

**Figura 9.** Una prueba de Mantoux diferencial mostrando un resultado positivo para *M. avium* (91).



El método permite distinguir entre una prueba positiva, que tiende a aumentar con el tiempo, y una positiva por reacción cruzada, que disminuye o permanece sin cambios con el tiempo (91).

Se han obtenido buenos resultados al utilizar la prueba para diagnosticar infecciones por *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* y *M. chelonae* (91). Los estudios con la sensitina de *M. avium* muestran la discriminación entre enfermedades por *M. tuberculosis* y la MNT en un 97% de los casos, pero la prueba aún está en estudio y sólo es usada en algunas regiones como Escandinavia (56).

**Determinación de perfiles de sensibilidad.** Las pruebas de susceptibilidad son una parte importante del diagnóstico porque permiten establecer un tratamiento adecuado para el paciente. Deben realizarse a los aislamientos de casos con significancia clínica como: cultivos positivos provenientes de sangre, fluidos estériles, tejidos o esputo, o cuyo agente causal sea una especie del complejo *M. avium* o una MCR como *M. kansasii* (51, 122). Según la Sociedad Torácica Americana (ATS) los criterios para determinar la significancia clínica incluyen además muestras con dos cultivos positivos y un resultado positivo de citología para BAAR; pero el cultivo positivo, negativo para BAAR o con un número bajo de microorganismos carece de significancia clínica (122).

Las pruebas pueden realizarse utilizando los métodos radiométricos, tradicionales -con cultivos sólidos o líquidos-, y con técnicas moleculares basadas en la PCR en conjunción con electroforesis, hibridación o secuenciación (94).

Normalmente, las MNT son sensibles a altas concentraciones de los fármacos antituberculosos, por lo que se deben considerar valores mayores para establecer la sensibilidad o resistencia; además, la mayoría de las especies de MCR tienen un patrón único de susceptibilidad (14, 62).

Los ocho antibióticos que inicialmente se recomiendan para las pruebas de susceptibilidad son: amikacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem, sulfametoxazol y tobramicina (14).

Las pruebas de susceptibilidad que utilizan el método radiométrico BACTEC (antes descrito) determinan si la proporción de resistencia a los fármacos es menor al 1%, por lo que se compara el índice de crecimiento en un vial control con el observado en uno de prueba. Para determinar la proporción de resistencia, el inóculo del control debe ser 100 veces menor al empleado en el vial de prueba, si el índice de crecimiento en el vial que contiene el fármaco es igual o mayor al del control, el aislamiento es considerado resistente (62).

Existen otros métodos diferentes para evaluar la susceptibilidad: a) difusión en agar, b) microdilución en caldo, c) prueba E y d) elución de discos en agar.

Cada método ha sido probado en su utilidad, pero hasta ahora ninguno ha sido bien estandarizado y se deben considerar sus ventajas y desventajas. Es importante mencionar que para las micobacterias exigentes se pueden usar medios enriquecidos al realizar las pruebas de susceptibilidad (14, 62).

★ **Difusión en agar.** Se prepara una suspensión de bacterias con una concentración equivalente al 0.5 de la escala de McFarland. Una vez obtenida, es inoculada en placas de agar Mueller-Hinton suplementado con ácido oleico-albúmina-dextrosa 5%. A continuación se colocan los discos de antibiótico y las placas son leídas después de 72 h de incubación a 30°C. El método es de fácil realización, permite observar la morfología colonial y detectar la presencia de cultivos contaminados. Sin embargo, dentro de sus desventajas se debe mencionar que la técnica para evaluar antibióticos nuevos como fluororquinolonas, claritromicina e imipenem no ha sido validada, además de que no se disponen discos de todos los antibióticos (e.g., sulfametoxazol y doxiciclina) y cuando la concentración del fármaco está cerca a la concentración mínima inhibitoria (MIC) -entre el rango de susceptibilidad y resistencia- existen problemas de interpretación al observar zonas de inhibición parciales. Debido a lo anterior, las decisiones terapéuticas no pueden ser realizadas basándose sólo en los resultados obtenidos con este método (14).

★ **Microdilución en caldo.** Inicialmente, en una microplaca de 96 pozos, se preparan diluciones dobles de cada fármaco en un caldo Mueller-Hinton

suplementado con cationes. Por otra parte, se resuspenden varias colonias de la micobacteria en un caldo tripticaseína soya o Mueller-Hinton hasta alcanzar un turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland. Los microorganismos son inoculados en los pozos de la microplaca, y se incuban cubiertas a 30°C por 3 días. La MIC de todos los fármacos corresponde a la concentración del primer pozo en el que no haya crecimiento; con excepción de las sulfonamidas, que se considera cuando se observa una disminución significativa del crecimiento en el pozo (80% de inhibición). Existen pruebas comerciales que pueden utilizarse, sin embargo no tienen las combinaciones ni concentraciones que se deben evaluar (14).

★ **Prueba E.** Esta técnica combina el método de difusión en agar con un gradiente exponencial de diluciones del fármaco. Dentro de las desventajas que tiene, se deben mencionar que no se cuenta con una cepa estándar o control que exhiba reproducibilidad en los resultados y resulta difícil establecer los criterios de susceptibilidad, así como la interpretación y reproducibilidad de los valores de MIC para las MCR (14).

★ **Elución de discos en agar.** Este método es muy utilizado en laboratorios donde se evalúan un número limitado de aislamientos y/o con poca frecuencia. Se usan discos comerciales de susceptibilidad, de los cuales el fármaco es eluido con ácido oleico-albúmina-dextrosa y luego es mezclado con agar fundido para obtener una concentración específica del fármaco. Las placas de agar se inoculan con una suspensión estandarizada que contenga



de 100 a 400 UFC/mL (14). La técnica utiliza discos comerciales y materiales que se preparan según la demanda. Es importante señalar que existe la posibilidad de que la distribución del fármaco en el agar sea irregular, permitiendo el crecimiento de microorganismos susceptibles en áreas donde la concentración del fármaco es menor, además algunas concentraciones no pueden alcanzarse por la cantidad de fármaco en los discos comerciales. Es recomendable no almacenar las placas por más de tres días porque los fármacos se degradan, y la suspensión del inóculo debe ajustarse con cuidado para evitar falsos positivos. Cabe mencionar que no hay estudios que validen los resultados obtenidos con este método para los nuevos antimicobacterianos (fluoroquinolonas, imipenem, linezólido y claritromicina), y algunos resultados para eritromicina y ciertos macrólidos, pueden ser mal interpretados como resistentes debido a que las cepas que son susceptibles producen colonias disgónicas o a que el efecto bactericida del fármaco es lento (14).

Los estudios de susceptibilidad deben repetirse si se continúan obteniendo cultivos positivos para micobacterias después de tres meses de tratamiento o si se reactiva la enfermedad (51).

Para detectar la susceptibilidad también pueden utilizarse métodos moleculares que buscan mutaciones que originan resistencia a los fármacos; clínicamente, la rifampicina es el único fármaco para el que se realizan análisis genotípicos, ya que la falta de susceptibilidad está definida por una

mutación en una sección pequeña del gen de la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (*ropB*) (121).

Recientemente se ha implementado en algunos laboratorios un análisis complementario para detectar resistencia a fluoroquinolonas, consiste en la búsqueda de mutaciones en las regiones que determinan la resistencia a quinolonas en los genes de la DNA girasa (*gyrA* y *gyrB*); permitiendo diferenciar entre MCR, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. szulgai* y *M. malmoense*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii* y *M. abscessus*, lo que con otros métodos no es posible (29).

No existe un método o guías aceptadas universalmente para realizar las pruebas de susceptibilidad, pero hay **recomendaciones acerca de algunas especies** como (122):

**MAC.** Los aislamientos se deben evaluar si tienen alguna de las siguientes características:

- ⇒ El paciente ha desarrollado bacteremia o experimentado recaída mientras recibía terapia preventiva con macrólidos.
  
- ⇒ Proceden de muestras con significancia clínica de pacientes con terapia de macrólidos, ya que aunque virtualmente todas las cepas de MAC son

susceptibles a este grupo de antibióticos, pueden desarrollar resistencia después de unos meses de monoterapia con estos fármacos debido a una mutación puntual en el dominio V del gen del ARNr 23S.

- ⇒ Los aislamientos provienen de muestras de sangre o tejidos de pacientes con enfermedad diseminada o con enfermedad pulmonar.
  
- ⇒ Si el paciente no muestra una mejoría, o tiene una deterioración clínica y aún se reportan cultivos positivos, las pruebas de susceptibilidad deben repetirse tres o seis meses después para pacientes con enfermedad diseminada o con enfermedad crónica pulmonar respectivamente.

Los fármacos que deben evaluarse son azitromicina y claritromicina, cabe subrayar que los resultados para claritromicina predicen los de azitromicina, fármaco para el cual la realización de la prueba resulta problemática debido a su baja solubilidad. En cuanto a los otros fármacos utilizados para el tratamiento (etambutol, rifampicina y clofazimina), los estudios no han mostrado correlación entre los resultados de susceptibilidad y los terapéuticos.

Las pruebas deben realizarse con métodos que utilicen medios líquidos con un pH de 6.8 a 7.4. Para la interpretación, el Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico (NCCLS) recomienda los criterios que se muestran en la tabla 6 (122).

**Tabla 6.** Interpretación de resultados de pruebas de susceptibilidad para el complejo *M. avium*

Fármaco	pH	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) para cada categoría		
		Susceptible	Intermedio	Resistente
Claritromicina	6.8	$\leq 16$	32	$\geq 64$
	7.3-7.4	$\leq 4$	8-16	$\geq 32$
Azitromicina	6.8	$\leq 128$	256	$\geq 512$

**M. kansasii.** Los fármacos que deben evaluarse son la rifampicina, etambutol e isoniazida, en especial si la terapia no ha funcionado o cuando se tiene una respuesta baja. Si la cepa es resistente a rifampicina, es conveniente valorar también la susceptibilidad a estreptomina, claritromicina, amikacina, ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol (122).

**M. marinum.** Las pruebas de rutina para esta especie no son recomendadas porque es susceptible a la mayoría de los agentes terapéuticos utilizados y el riesgo de adquirir resistencia por una mutación es mínimo. Sin embargo, se debe considerar su realización si el paciente no muestra respuesta clínica después de meses de terapia y continúa teniendo resultados de cultivo positivos. Bajo este contexto, se recomienda utilizar todos los métodos porque no se cuenta con estudios que avalen el uso de alguno en específico (122).

**Especies de crecimiento lento.** Para especies como *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. xenopi* y *M. simiae*, se recomienda hacer lo indicado para *M. kansasii*, aunque no es posible recomendar un método específico. Algo similar ocurre para especies exigentes como *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. malmoense* y *M. ulcerans* (122).

**Especies de crecimiento rápido.** El NCCLS recomienda el método de microdilución en caldo para probar la susceptibilidad de las MCR (Grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, Grupo *M. smegmatis* y *M. mucogenicum*), y propone los criterios en la tabla 7 para interpretar los resultados que se obtengan (14, 122).

A pesar de que el procedimiento es sencillo, la interpretación de los resultados para estas micobacterias no siempre es fácil, por lo que se debe desarrollar habilidad para realizarla adecuadamente (122).

**Tabla 7.** Interpretación de resultados de pruebas de susceptibilidad para MCR  
(Microdilución en caldo)

Fármaco	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) para cada categoría		
	Susceptible	Intermedio	Resistente
Fármacos de evaluación recomendada			
Amikacina	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Cefoxitina	$\leq 16$	32-64	$\geq 128$
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Claritromicina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Doxiciclina	$\leq 1$	2-8	$\geq 16$
Imipenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Sulfametoxazol	$\leq 32$	-	$\geq 64$
Tobramicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Fármacos de evaluación secundaria			
Cefmetazol	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Gatifloxacina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Levofloxacina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Linezólido	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Moxifloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Vancomicina	$\leq 4$	8-16	$\geq 32$

Las siguientes son observaciones relevantes sobre las pruebas de susceptibilidad para MCR (14):

- ☞ La evaluación de tobramicina sólo es recomendada para *M. chelonae*; cuyos resultados han sido validados por estudios interlaboratorio.
  
- ☞ Se recomienda repetir la evaluación para cualquier aislamiento de *M. abscessus* con una MIC para amikacina  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  y/o ser enviado a un laboratorio de referencia, ya que la resistencia al fármaco no es usual a menos que haya ocurrido una mutación en el gen del ARNr 16S.
  
- ☞ Los valores de MIC para imipenem de especies como *M. chelonae* y *M. abscessus* no deben reportarse porque no son reproducibles, por lo que tampoco debe repetirse la prueba.
  
- ☞ La prueba de resistencia a sulfonamidas no es necesaria si se trata de una cepa de *M. fortuitum*, puesto que la especie es resistente a este grupo de fármacos.
  
- ☞ Si los resultados del cultivo continúan siendo positivos después de seis meses de terapia, se deben repetir las pruebas de susceptibilidad así como las de identificación de especie (122).

## V. ASPECTOS ASOCIADOS AL TRATAMIENTO

En general, las principales estrategias terapéuticas para las enfermedades producidas por MNT son el tratamiento quirúrgico y el uso de antibióticos, aunado a una nutrición e hidratación adecuada para mantener o reestablecer un buen estado nutricional; siendo particularmente importante en pacientes con enfermedad pulmonar y diseminada, quienes presentan pérdida de peso moderada o severa (4, 62).

La **PROFILAXIS** es utilizada en pacientes con SIDA, se basa en el uso de antibióticos como rifabutina, claritromicina o azitromicina con el fin de prevenir y retrasar el desarrollo de enfermedad diseminada. El tratamiento antirretroviral de alta eficacia (HAART) que también utilizan los pacientes con SIDA, disminuye el riesgo de padecer la enfermedad diseminada (62, 84).

El **TRATAMIENTO QUIRÚRGICO** es recomendado para el manejo de la linfadenitis cervical, algunas infecciones localizadas originadas por micobacterias resistentes como *M. scrofulaceum* y en el caso de la enfermedad pulmonar al realizar la resección parcial del pulmón (36, 62).

La cirugía también se utiliza cuando se ha acumulado pus, el tejido se ha necrosado, en infecciones debidas a *M. fortuitum*, *M. chelonae* y en algunos casos por *M. marinum* y *M. ulcerans*. Para estas especies se han utilizado otras opciones terapéuticas como la aplicación de calor (hasta 40°C) al área involucrada, crioterapia, electrodesecación e irradiación, pero no se ha tenido tanta efectividad (36, 62).

Las opciones de tratamiento con **ANTIBIÓTICOS** son limitadas debido a que la terapia resulta difícil, larga y en ocasiones inefectiva porque los fármacos producen efectos secundarios significativos y aproximadamente 20 especies de las MNT de importancia clínica tienen patrones de susceptibilidad diferentes, de manera que la elección de los fármacos a utilizar se debe basar en los resultados obtenidos en pruebas o perfiles de susceptibilidad, en especial si se trata de una MCR, las cuales son resistentes a los tratamientos estándar (36, 62, 111).

Es importante mencionar que el tratamiento debe combinar de tres a cinco fármacos -según la gravedad del caso- para evitar la selección de mutantes resistentes (62).

Como acciones iniciales, se recomienda el aislamiento de la MNT y utilizar durante dos semanas la terapia antituberculosis (ATT), en la que se incluyen fármacos de primera línea, es decir aquellos que son muy eficaces y cuya toxicidad es baja como: isoniazida (actúa como antimetabolito de nicotinamida



y piridoxal e inhibe la síntesis de ácidos micólicos), rifampicina (ver rifamicinas), etambutol (bloquea la enzima arabinosil transferasa involucrada en la síntesis de la pared celular) y pirazinamida (es metabolizado a ácido pirazinoico pero su mecanismo de acción se desconoce) (62).

A continuación se mencionan algunos aspectos relevantes de los fármacos que se utilizan para el tratamiento de los padecimientos causados por MNT (4, 14, 18, 36, 52, 53, 62, 69, 83, 84):

- **Rifamicinas** (ej.: rifabutina). Tienen como sitio de acción la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa de la micobacteria, formando un complejo estable con la enzima que impide la iniciación de la cadena en la síntesis de ARN, pero no su elongación. La rifampicina se distribuye en muchos órganos y fluidos, incluyendo el líquido cefalorraquídeo.

- **Macrólidos** (ej.: claritromicina, azitromicina). Están formados por una macrolactona de 15 miembros a la que se unen desoxiazúcares. Inhiben la síntesis de proteínas al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma. Se absorben rápidamente después de su administración oral y alcanzan altas concentraciones intracelulares. Son los únicos agentes antimicrobianos cuya correlación entre la susceptibilidad *in vitro* y respuesta clínica ha sido demostrada en estudios clínicos controlados.

• **Fluoroquinolonas** (ej.: ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina). Son derivados del ácido nalidíxico con un átomo de flúor en la posición 6 del anillo de quinolona. Se unen a las subunidades A y B de la girasa -enzima que produce el superenrollamiento del ADN-, inhibiendo la replicación del ADN.

• **Aminoglucósidos** (ej.: amikacina, tobramicina, kanamicina, estreptomycin). Son aminoazúcares ligados por enlaces glucosídicos a un anillo de aminociclitol (una ciclohexosa con grupos amino). Afectan la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosómica 30S e interfieren su comienzo al fijar el complejo 30S-50S al codón de inicio (AUG). También ocasionan la lectura errónea del ARNm causando la terminación prematura de la traducción. Además, se debe considerar que todos los aminoglucósidos son policationes, por lo que se unen a los sitios con carga negativa en la parte externa de la membrana bacteriana alterando también su integridad.

• **Cefalosporinas** (ej.: cefoxitina). Son antibióticos  $\beta$ -lactámicos formados por un anillo de dihidrotiazina. Se unen a las proteínas de unión a penicilinas (PBP) afectando la síntesis de la pared celular.

• **Carbapenems** (ej.: imipenem-cilastatina, meropenem). Estos antibióticos se unen covalentemente a las PBP que están involucradas en la biosíntesis de la

pared celular. La cilastatina se asocia comúnmente con imipenem porque bloquea su metabolismo.

- **Tetraciclinas** (ej.: minociclina, doxiciclina). Se unen a la subunidad 30S del ribosoma bloqueando la unión del ARNt, lo que impide la elongación de los péptidos y por lo tanto la síntesis de proteínas.

- **Oxazolidinonas** (ej.: linezolido). Actúan uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma impidiendo la formación del complejo de iniciación para la síntesis de proteínas.

- **Ketólidos** (ej.: telitromicina). Los ketólidos se relacionan químicamente con los macrólidos y afectan la síntesis de proteínas al unirse a dos sitios de la subunidad ribosomal 50S con mayor afinidad. La telitromicina es un derivado de la eritromicina A.

- **Etionamida**. Es un análogo estructural de la isoniazida; al igual que ésta, se une a la enzima InhA, afectando la biosíntesis de los ácidos micólicos.

- **Clofazimina**. Es una fenazina que parece unirse con preferencia al ADN de las micobacterias -rico en guanina y citosina- inhibiendo la replicación y transcripción; también tiene un efecto antiinflamatorio.

- **Trimetoprim sulfametoxazol (TMP-SMX).** El TMP Inhibe específicamente la enzima dihidrofolato reductasa y por lo tanto la formación del ácido tetrahidrofólico, que se necesita para la transferencia del C1 durante la síntesis de la timina y las purinas necesarias para la división celular. El SMX es un análogo estructural del ácido p-amino benzoico, inhibe competitivamente a la enzima dihidropteroato sintasa, impidiendo la formación de dihidrofolato.

Las **estreptograminas** como la quinupristina y dalfopristina, son otro grupo de fármacos que han resultado más efectivos contra ciertas micobacterias como *M. marinum*, pero todavía no se han implementado en la terapéutica (11, 62). Estos fármacos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 50S del ribosoma; la quinupristina previene la elongación de la cadena peptídica y la dalfopristina inhibe la peptidiltransferasa (52).

En la tabla 8 se muestran algunas características de los fármacos mencionados que deben tomarse en consideración para el tratamiento de las afecciones producidas por MNT.

**Tabla 8.** Características de los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de enfermedades por MNT (4, 84)

Fármaco	Tratamiento de primera línea para:	Tratamiento alternativo para:	Régimen de dosificación <sup>6</sup>	Efectos secundarios
Isoniazida	<i>M. kansasii</i> , <i>M. scrofulaceum</i>	MAC, <i>M. malmoense</i>	5 mg/kg/día hasta 300 mg/día	Hepatotoxicidad y neuritis periférica
Rifampicina <sup>4</sup>	<i>M. kansasii</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. leprae</i>	MAC	10 mg/kg/día hasta 600 mg/día	Fluidos (lágrimas, saliva, sudor, orina) pueden adquirir coloración marrón-anaranjada, colestasis hepática y sarpullido
Etambutol	MAC, <i>M. genavense</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i>	-	15-25 mg/kg/día	Neuritis óptica e hiperuricemia
Rifabutina	MAC	<i>M. gevaranense</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. kansasii</i>	300 mg/día	Uveítis, cambio en la coloración de fluidos, sarpullido, hepatitis, leucopenia, lupus
Tobramicina	<i>M. chelonae</i>		3-5 i.v. mg/kg/día	Nefrototoxicidad y ototoxicidad
Estreptomicina	<i>M. scrofulaceum</i>	MAC, <i>M. kansasii</i> , <i>M. xenopi</i>	15 mg/kg i.m. o i.v. 3-5 veces/semana	Nefrototoxicidad y ototoxicidad
Amikacina	<i>M. abscessus</i>	MAC, <i>M. fortuitum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. xenopi</i>	6.0-7.5 mg/kg i.m. o i.v. 1-2 veces/día	Nefrototoxicidad y ototoxicidad

<sup>4</sup> En pacientes con VIH la sustitución de rifampicina por rifabutina minimiza la interacción con los inhibidores de proteasas y de la transcriptasa reversa (52).

<sup>5</sup> Dosis para adultos considerando administración oral y función renal normal.

Tabla 8. Características de los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de enfermedades por MNT (continuación)

Fármaco	Tratamiento de primera línea	Tratamiento alternativo	Régimen de dosificación <sup>5</sup>	Efectos secundarios
Claritromicina	MAC, <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. gevarnense</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i>	<i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. scrofulaceum</i>	500 mg 2 veces/día	Toxicidad gastrointestinal
Azitromicina	<i>M. abscessus</i>	Alternativa para claritromicina	500 mg/día	Toxicidad gastrointestinal
Ciprofloxacina	MAC, <i>M. fortuitum</i> , <i>M. haemophilum</i>	<i>M. chelonae</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. xenopi</i>	500-750 mg 2 veces/día	Toxicidad gastrointestinal e hipersensibilidad
Levofloxacina	MAC, <i>M. fortuitum</i> , <i>M. haemophilum</i>	<i>M. chelonae</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. xenopi</i>	500 mg/día	Hipersensibilidad, mareos y toxicidad gastrointestinal
Cefoxitina	<i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i> , <i>M. haemophilum</i>	2 g i.v. cada 4-6 h	Hipersensibilidad
Imipenem / Cilistatina	<i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i>	<i>M. abscessus</i>	500 mg i.v. cada 6 h	Toxicidad neurológica
Doxiciclina	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	100-200 mg 2 veces/día	Toxicidad gastrointestinal y fotosensibilidad
Clofazimina	<i>M. leprae</i>	MAC	50-100 mg/día	Toxicidad gastrointestinal, hiperqueratosis, depósitos de microcristales en el cristalino
Trimetoprim sulfametoxazol	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. marinum</i>	<i>M. chelonae</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. kansasii</i>	800-1600 mg 2 veces/día	Supresión de médula ósea e hipersensibilidad

<sup>5</sup> Dosis para adultos considerando administración oral y función renal normal.

Las guías de la ATS dan una base de la farmacoterapia a seguir en caso de infección por ciertas MNT (consultar la Tabla 9) (4).

**Tabla 9.** Farmacoterapia recomendada por la ATS (4).

<b>Especie o complejo</b>	<b>Régimen de elección</b>
<i>MAC</i>	Claritromicina + etambutol con o sin rifabutina, ciprofloxacina o levofloxacina
<i>M. kansasii</i>	Isoniazida + rifampicina + etambutol
<i>M. haemophilum</i>	Rifampicina + claritromicina + ciprofloxacina
<i>M. marinum</i>	Infecciones superficiales: etambutol + rifampicina o uno o dos de los siguientes: claritromicina, minociclina/doxiciclina, TMP-SMX
<i>M. genavense</i>	Claritromicina + etambutol con o sin rifabutina
<i>M. malmoense</i>	Rifampicina + etambutol
<i>M. ulcerans</i>	Claritromicina + rifampicina + etambutol
<i>M. scrofulaceum</i>	Etambutol + rifampicina con o sin claritromicina
<i>M. fortuitum</i>	Enfermedad pulmonar: Claritromicina + doxiciclina, TMP-SMX o levofloxacina Infección por catéter: Cefoxitina + amikacina con o sin claritromicina
<i>M. chelonae</i>	Enfermedad cutánea: Claritromicina + ciprofloxacina Enfermedad sistémica: Claritromicina + imipenem + tobramicina
<i>M. abscessus</i>	Claritromicina + amikacina + cefoxitina

Se sugiere que la duración los tratamientos sea de 12 a 24 meses, lo que se ha establecido basándose en los índices de recaídas si la administración se termina tempranamente (4).

A continuación, se hace referencia a algunos aspectos que se recomienda considerar para el tratamiento específico de las enfermedades cuyos agentes etiológicos son MNT.

**Enfermedad diseminada.** Para el tratamiento inicial se pueden utilizar rifampicina, azitromicina, fluoroquinolonas, aminoglicósidos, doxiciclina, TMP-SMX, cefoxitina o imipenem-cilastatina. Se debe observar la desaparición de los síntomas, así como resultados negativos del cultivo para muestras que inicialmente eran positivas (4).

**Enfermedad pulmonar.** Cuando el organismo está identificado, la farmacoterapia está basada en el régimen recomendado para tratar al microorganismo específico; aunque se deben hacer ajustes cuando se tengan disponibles los resultados de susceptibilidad (4, 84).

En casos debidos a *M. abscessus*, la cura sólo se logra con cirugía, trasplantes o bien se requiere mucho tiempo de tratamiento con antibióticos. Además, al llevar a cabo un trasplante se debe considerar que la terapia inmunosupresiva que se utiliza después de la cirugía, incrementa el riesgo de infecciones oportunistas, incluyendo aquellas causadas por micobacterias (4, 93).

**Adenitis.** Cuando se sospecha de linfadenitis por micobacterias, se utiliza empíricamente la ATT hasta que se confirme el agente etiológico. En muchos casos la extirpación quirúrgica ha aumentado el índice de curación y resulta la opción de tratamiento, pero frecuentemente no es posible debido al riesgo de dañar estructuras vecinas o drenar inadvertidamente los nódulos, causando la reactivación de la enfermedad. Así, cuando la extirpación total no es posible,



usualmente se utiliza una terapia triple que consiste en un macrólido de nueva generación, una rifamicina y etambutol por un periodo mayor a 6 meses, tal vez durante 12 a 24 meses, aunque se debe efectuar la determinación de la sensibilidad a los fármacos que se pretenden utilizar (4, 84).

La eficacia del tratamiento farmacológico postoperatorio es objeto de discusión entre varios autores, ya que algunos creen que debería limitarse solo a aquellos casos en los que la cirugía total no fue posible o si se presenta una infección residual (91).

***Infecciones en piel, hueso y tejidos blandos.*** Las guías para el tratamiento de estas enfermedades no están bien establecidas. Las recomendaciones que existen, no están basadas en estudios clínicos adecuados debido a la naturaleza esporádica de estas enfermedades, por lo que se han extrapolado de terapias utilizadas para otras infecciones más comunes (4, 36).

Existen diferentes esquemas de tratamientos con varios fármacos con una actividad *in vitro* aceptable como amikacina, minociclina, claritromicina, cefoxitina, doxiciclina y ciprofloxacina, siendo éstos dos últimos los más utilizados. En pacientes inmunodeprimidos se recomienda el uso de tres fármacos (83).

La duración de la terapia se aproxima a los periodos más prolongados que usualmente se recomiendan y deben monitorearse diferentes parámetros para

evaluar la respuesta al tratamiento; si la infección es local, los fármacos deben administrarse por 3 a 6 meses, o hasta que las lesiones desaparezcan, y si están involucrados tejidos profundos, la cirugía es necesaria para el control adecuado de la infección (4, 36).

**Otras infecciones.** Para tratar la queratitis crónica comúnmente se elige amikacina, y si se trata de una infección producida por *M. fortuitum*, se ha propuesto el uso de claritromicina. Algunos autores sugieren que el uso de moxifloxacina reduce la morbilidad de la queratitis por MNT, pero se requieren estudios clínicos para determinar la actividad *in vivo*, ya que a pesar de las alternativas de tratamiento, la infección puede no responder a los fármacos o la cirugía (2).

El tratamiento de las infecciones derivadas por el uso de catéteres incluye la remoción del catéter, escisión quirúrgica y drenado si es necesario, así como la administración de antibióticos durante 2 a 4 meses (4).

En el caso de la enfermedad de Crohn, se recomienda el uso de azitromicina y claritromicina, pero la terapia debe incluir varios fármacos dado que la infección por *M. paratuberculosis* es difícil de erradicar porque esta especie es resistente a los agentes antituberculosos comúnmente utilizados (19).

Es conveniente mencionar que existen algunas recomendaciones de tratamiento para ciertas especies, las cuales se describen a continuación:

» **MAC**. Es resistente a la mayoría de los agentes antimicobacterianos y los pacientes frecuentemente sufren recaídas después de la terapia (36, 104). Las recomendaciones para el tratamiento de la infección por MAC se han derivado de estudios en pacientes con SIDA y enfermedad diseminada (4). Se necesitan varios fármacos para erradicar la infección, y en casos donde es limitada, la escisión quirúrgica es lo indicado (36).

Se recomienda que la duración del tratamiento sea de 18 a 24 meses, hasta que se tengan cultivos negativos por un año (4, 36). El tratamiento debe continuar indefinidamente en pacientes con SIDA en estado avanzado, pero puede ser discontinuado de forma segura después de 12 meses si el paciente ha sido tratado con HAART y presenta reconstitución inmune; ésta última definida como una cuenta de linfocitos  $CD4 > 100/mm^3$  por al menos 6 meses (84).

Los macrólidos son esenciales en el tratamiento de las infecciones por MAC, ya que permiten disminuir o eliminar la bacteremia y otros síntomas. Una enfermedad de mayor gravedad requiere adicionar un tercer fármaco, como ciprofloxacina o rifabutina, así como una corta administración de amikacina o estreptomina (4, 52). Otras formas de tratamiento que han resultado efectivas son la inmunoterapia y cirugía, aunque su eficiencia aún debe ser determinada (56).

Los estudios en los que se combinan altas dosis de rifabutina con macrólidos, han mostrado múltiples efectos adversos, entre los que se mencionan: disminución en el número de células blancas, síntomas gastrointestinales, función anormal del hígado, poliartralgias y uveitis anterior (inflamación del iris y el cuerpo ciliar) (56). La amikacina debe administrarse por un periodo de dos o tres meses y es importante monitorear al paciente para evitar la toxicidad renal y del oído (52).

Aunado a los efectos adversos, se debe considerar la múltiple interacción entre los fármacos debido a la inducción del sistema del citocromo P450, lo que aumenta su metabolismo hepático y afecta la biodisponibilidad, metabolismo o excreción de alguno de ellos, de manera que la administración de una terapia compleja debe ser consultada con otros especialistas. Esta situación se observó en un estudio donde las interacciones entre los fármacos utilizados causaron la discontinuación del tratamiento en un 46% de los pacientes (52, 84).

Para infecciones cutáneas, se han obtenido buenos resultados con la escisión quirúrgica y el uso de etambutol y claritromicina; la duración óptima se desconoce, pero usualmente se utilizan por 6 a 12 meses (83).

» ***M. kansasii***. Los fármacos de primera línea para esta micobacteria son los utilizados en la ATT, con excepción de la pirazinamida, ya que no tiene

actividad contra esta especie. La rifampicina es el fármaco crucial para el tratamiento de la enfermedad pulmonar producida por *M. kansasii*, solo se han reportado 1% de resultados desfavorables en diversos estudios (4).

La claritromicina, ciprofloxacina, levofloxacina y TMP-SMX pueden reemplazar la isoniazida y el etambutol usados en la ATT, especialmente si se establece la resistencia o no se observa mejoría. Se recomienda que la duración del tratamiento sea al menos de 18 meses (4).

» **MCR.** La quimioterapia para estas especies varía dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, a diferencia de la que se usa para la mayoría de las micobacterias de crecimiento lento. Se puede utilizar solo un fármaco con mínimo riesgo de producir mutaciones que originen resistencia si la afección es localizada; pero si se trata de una enfermedad diseminada (cutánea o pulmonar), usualmente se necesita la administración de varios antimicrobianos por vía oral e intravenosa (14).

Se debe hacer notar que las MCR son resistentes a todos los fármacos antituberculosos de primera línea y son susceptibles a algunos de segunda línea<sup>6</sup> como fluoroquinolonas, amikacina, ceftoxitina e imipenem; por lo que es conveniente evaluar la susceptibilidad a linezolido, SMX, doxiciclina o

---

<sup>6</sup> Fármacos menos activos que producen más efectos secundarios.

minociclina, ciprofloxacina y gatifloxacina. En el caso de *M. fortuitum* y *M. chelonae* este último fármaco es más activo (4).

Generalmente, para las infecciones de piel, tejido blando o huesos, la duración del tratamiento con cualquiera de los fármacos es de 4 meses o 6 si es grave; si se utilizan agentes de administración i.v., se limita a un tiempo de 2 a 6 semanas para minimizar el costo y la toxicidad. Para la enfermedad pulmonar, el tratamiento dura por lo menos 12 meses, pero si el agente etiológico es *M. abscessus* la curación no es posible aún con un tratamiento prolongado (14).

Dentro de este grupo, *M. abscessus* causa cuatro de cada cinco casos de infección pulmonar debida a MCR, posiblemente sea la micobacteria más resistente a la terapia farmacológica, puesto que solo algunos antibióticos como la claritromicina, amikacina, cefoxitina y azitromicina tienen actividad consistente en contra de este microorganismo. Como régimen inicial, durante las primeras 2 a 6 semanas, se recomienda el uso de claritromicina, amikacina y cefoxitina (o imipenem), medicinas de administración i.v. cuyo uso es limitado por el costo, toxicidad y la necesidad de administración frecuente. La mayoría de los pacientes mejoran con la administración parenteral por 2 a 4 semanas, pero pocos toleran los fármacos por períodos prolongados y la enfermedad no se cura totalmente, por lo que es adecuado dar administraciones intermitentes para el control o supresión de la enfermedad. Si la enfermedad es localizada, solo la resección quirúrgica ha demostrado la

resolución completa de los síntomas de los pacientes infectados con *M. abscessus* (4, 14).

Por otra parte, *M. fortuitum* causa el 20% de los casos de enfermedad pulmonar producidos por MCR. Este microorganismo es más susceptible a la terapia que *M. abscessus*; la duración del tratamiento es de 6 a 12 meses y frecuentemente se logra la cura, inclusive la infección localizada en individuos inmunocompetentes se puede aliviar sin el uso de fármacos en 6 ó 12 meses. Las infecciones suaves en la piel deben tratarse con claritromicina y un antibiótico oral (doxiciclina, TMP-SMX, ciprofloxacina, levofloxacina, minociclina) durante 2 meses; para aquellas que involucran áreas mayores o tejidos profundos, se recomienda la terapia i.v. con amikacina, ceftazidim o imipenem por 4 a 6 meses; en los casos de infecciones refractarias, se han obtenido buenos resultados utilizando claritromicina, ceftazidim y amikacina con IFN- $\gamma$  como adyuvante (4, 36).

Para las infecciones por *M. chelonae* se recomienda tobramicina e imipenem vía i.v. en combinación con claritromicina para minimizar el desarrollo de resistencia al macrólido. Los autores reportan que un cuarto de los aislamientos de esta especie son susceptibles a doxiciclina y ciprofloxacina, por lo que uno de estos fármacos puede ser utilizado con claritromicina. No se recomienda el uso de ceftazidim porque la mayoría de los aislamientos son resistentes (14, 36).

» ***M. haemophilum***. No existen estudios que establezcan una terapia estándar para tratar las infecciones diseminadas o cutáneas producidas por este microorganismo (4, 36).

En las últimas revisiones de casos, se han descrito terapias con dos o tres fármacos que incluyen la rifampicina, claritromicina, amikacina y ciprofloxacina. La duración de la terapia en pacientes inmunocompetentes o con reconstitución inmune es de 6 a 9 meses, pero en individuos inmunosuprimidos debe ser mayor o incluso indefinida ya que los índices de respuesta son variables (4, 36).

» ***M. xenopi***. Para el tratamiento de las enfermedades producidas por esta micobacteria, se tienen reportes con resultados exitosos utilizando claritromicina combinada con rifampicina y etambutol. La ATS recomienda estos fármacos para la terapia inicial de la infección pulmonar, aunque hay mucha inconsistencia entre los resultados de susceptibilidad *in vitro* y la respuesta clínica. Se recomienda que la duración de la terapia sea de 18 a 24 meses; si se realiza la resección quirúrgica, el tratamiento posterior con antibióticos debe tener una duración mínima de 18 meses (4, 8).

» ***M. malmoense***. El tratamiento de la enfermedad pulmonar y su duración es similar al de *M. xenopi*, aunque también se han obtenido buenos resultados con los regímenes utilizados para MAC. En un estudio, se comparó



rifampicina y etambutol, con o sin isoniazida; observándose mejoría en 90% de los pacientes tratados, aunque la cura sólo se logró en un 42% y la mortalidad alcanzó el 34% (4, 62).

» ***M. marinum***. Las infecciones cutáneas que esta especie produce en pacientes inmunocompetentes se resuelven sin tratamiento en 2 años, pero la terapia ayuda a resolver la infección con prontitud. Como régimen de elección se ha considerado el uso de claritromicina con etambutol o rifampicina durante 3 a 6 meses, aunque el tratamiento debe establecerse para cada caso en base a las pruebas de susceptibilidad; también puede utilizarse una terapia con 1 ó 2 fármacos como claritromicina, minociclina, doxiciclina o TMP-SMX. Cuando se tienen casos resistentes o diseminados, la cirugía puede combinarse con rifampicina y etambutol, pero la duración del tratamiento depende de la respuesta clínica y puede llegar hasta 12 meses (4, 62, 83).

» ***M. ulcerans***. El tratamiento primario de la enfermedad producida por esta micobacteria es la cirugía, puesto que no se han obtenido resultados favorables con la farmacoterapia. La enfermedad temprana puede responder a un régimen con claritromicina, rifampicina y etambutol, pero la duración óptima de la terapia no se conoce (4).

## ALTERNATIVAS EN ESTUDIO

La gran resistencia de las micobacterias a los fármacos disponibles resalta la importancia de continuar con la investigación para encontrar nuevas herramientas terapéuticas efectivas. A continuación se describen algunas opciones de tratamiento que se encuentran en desarrollo.

**Mefloquina.** Es un fármaco utilizado ampliamente para la profilaxis de la malaria, pero se ha observado que tiene actividad *in vivo* en contra de *M. avium*. En un estudio con ratones, la administración de mefloquina junto con moxifloxacina y etambutol mostró resultados favorables, muy similares a los que se registran utilizando un régimen con macrólidos, lo que se atribuye a que la mefloquina puede tener como sitio "blanco" algún punto de la síntesis de la pared celular (7).

**Terapia con fagos.** Los fagos pueden encontrarse en cualquier ambiente que haya sido colonizado por bacterias, existe una gran diversidad y su infección es específica de cada microorganismo. Los fagos no pueden pasar a través de la membrana, por lo que se requieren estrategias para que llegue al patógeno intracelular (15, 74).

La terapia con fagos es utilizada en Europa y países de la ex-Unión Soviética para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Salmonella* (74).

Los fagos que infectan a las micobacterias (micobacteriófagos) fueron identificados en 1946, pero no han sido muy estudiados. La mayoría tienen ADN de doble cadena y, a diferencia de otros bacteriófagos, no se han identificado en ellos genes que codifiquen para toxinas, lo que resulta una ventaja para su uso (74).

Los modelos experimentales en los que utiliza *M. smegmatis* infectado con el fago TM4 para tratar macrófagos infectados con *M. avium*, demuestran que el virus infecta y destruye a las bacterias patógenas, disminuyendo el número de micobacterias después de 4 días, siendo este efecto similar o mejor al obtenido con los macrólidos que se usan terapéuticamente (15).

Es posible que este tipo de terapia sea utilizada en un futuro para el tratamiento de la úlcera de Buruli, donde el sitio de infección es accesible; sin embargo, aún se requieren estudios que la avalen (74).

**Inmunoterapia.** La manipulación de la respuesta inmune del hospedero ha sido considerada como opción para el tratamiento de las enfermedades por micobacterias. Los principales puntos en los que se ha enfocado el estudio para el control de estas enfermedades son las citocinas, tales como IL-2, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-12, TNF- $\alpha$  y GM-CSF (55).

▸ **Interleucina 2 (IL-2).** Es un heterodímero secretado principalmente por los macrófagos en respuesta a un estímulo inflamatorio como la ingestión de la micobacteria. Tiene un papel central en el control de las enfermedades micobacterianas a través de la expansión clonal de los linfocitos T. Bajo la influencia de la IL-2 y otros estímulos como la IL-12, las células T producen IFN- $\gamma$  y activan al macrófago infectado para matar al microorganismo intracelular. En estudios *in vitro* realizados con células NK (natural killer) y monocitos infectados con MAC, los resultados muestran que la lisis de éstos aumenta cuando las células NK son expuestas a IL-2, y el efecto es sinérgico al utilizar IL-2 y TNF- $\alpha$  (1, 55).

▸ **IL-12.** Es un heterodímero producido principalmente por macrófagos y células dendríticas. Esta citocina tiene actividad antimicobacteriana *in vivo* e *in vitro*; algunos autores reportan su utilidad para el tratamiento de la enfermedad pulmonar refractaria a IFN- $\gamma$  producida por *M. abscessus*, aunque su uso terapéutico no se ha desarrollado (1, 55).

▸ **Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).** Es un homodímero producido por los linfocitos NK, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en respuesta a IL-12 o al reconocimiento antigénico (1). Activa los neutrófilos y macrófagos para producir EROS y NO<sup>•</sup>, aumenta la expresión del complejo principal de histocompatibilidad y de los receptores Fc, disminuye el pH lisosomal e incrementa la concentración intracelular de ciertos antibióticos (55).

Tiene muchos efectos en la fagocitosis, pero no se conoce el mecanismo a través del cual actúa para controlar a las micobacterias y su participación en la regulación del crecimiento micobacteriano es controversial, ya que los resultados al estudiar sus efectos en células humanas son inconsistentes; se ha sugerido que el IFN- $\gamma$  tiene una actividad bactericida y bacteriostática al acidificar las vesículas donde se encuentran las micobacterias, pero otros resultados muestran que favorece el crecimiento en los macrófagos (55).

El primer estudio que utilizó IFN- $\gamma$  para el tratamiento de la enfermedad diseminada por MAC —en pacientes con SIDA— obtuvo buenos resultados sólo combinándolo con el uso de fármacos. No se sabe con exactitud como actúa, pero se ha observado que tanto el IFN- $\gamma$  como el TNF- $\alpha$  incrementan considerablemente la concentración intracelular de los macrólidos utilizados (55).

Otros autores han administrado, con resultados muy favorables, el IFN- $\gamma$  vía subcutánea para tratar la enfermedad diseminada por MAC y otras infecciones por MNT en pacientes con producción deficiente de IL-12. El tratamiento tuvo una duración de un año o más si era evidente la persistencia de la enfermedad o su agravamiento. De 23 pacientes, solo tres presentaron recaída después de la discontinuación del tratamiento y los índices de curación fueron del 60% (55, 56).

También se ha evaluado el uso de IFN- $\gamma$  aerolizado para tratar la enfermedad pulmonar; los mejores resultados se obtuvieron en los casos donde no se existieran cavernas que comprometieran la entrada de la citocina al pulmón, pero al interrumpir el tratamiento, los efectos se revirtieron (55).

▸ **Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).** Es una glicoproteína producida por los linfocitos T, macrófagos activados, células NK y neutrófilos. Estimula la hematopoyesis y activa la producción de superóxido. Un estudio en pacientes con SIDA a los que se les administró GM-CSF vía subcutánea y azitromicina por 6 semanas, mostró disminución en la cuenta de micobacterias, resultados similares a los reportados al administrar GM-CSF a ratones infectados con MAC (1, 55).

▸ **Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).** Es el principal mediador de la respuesta para controlar a las micobacterias; es secretado primordialmente por los fagocitos mononucleares activados. Algunos autores reportan que al neutralizar la citocina con anticuerpos, se impide la respuesta granulomatosa y que los animales deficientes en el receptor para TNF- $\alpha$  son más susceptibles a la infección. Su utilidad terapéutica ha sido evaluada en ratones, siendo eficaz cuando es administrado junto con fármacos antimicobacterianos e IL-2, ya que ayuda a incrementar la concentración del fármaco en el interior del macrófago; sin embargo, aún es necesario realizar más estudios para evaluar su potencial terapéutico (1, 55).

Los resultados de las diversas alternativas terapéuticas demuestran la necesidad de realizar estudios controlados que permitan establecer la mejor opción de tratamiento, así como sistemas de liberación que favorezcan la respuesta en los diferentes grupos de pacientes.

## CONCLUSIONES

- a) Las micobacterias no tuberculosas (MNT) muestran una distribución muy amplia en la naturaleza y, si bien a una buena parte de ellas se le considera como saprofitas, numerosas cepas figuran como oportunistas o patógenas consistentes, destacando las integrantes del MAC, así como *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.
  
- b) Los padecimientos producidos por MNT pueden afectar varios órganos y tejidos, evidenciando un gran espectro de manifestaciones clínicas, dependiendo de la región anatómica afectada. Los de mayor frecuencia son la enfermedad diseminada, infecciones pulmonares y las enfermedades cutáneas como la úlcera de Buruli.
  
- c) Actualmente, las infecciones causadas por MNT representan el 0.5 a 30% de las enfermedades producidas por micobacterias, afectando predominantemente a las personas inmunocomprometidas.
  
- d) Los factores de virulencia de las MNT incluyen componentes de la envoltura celular, enzimas y otras moléculas que actúan como moduladores de la respuesta inmune. Su función global consiste en



favorecer la colonización, proliferación y supervivencia micobacteriana en diversos tejidos del hospedero.

- e) Las metodologías de laboratorio utilizadas para llevar a cabo la identificación de estos patógenos incluyen técnicas de índole microbiológica, cromatográfica y molecular. Las de esta última categoría son más rápidas y proporcionan resultados más confiables, aunque resultan considerablemente más costosas.
- f) En general, el diagnóstico molecular tiene como "blanco" principal a ciertas secuencias de ARNr y a los genes que codifican para sus respectivas síntesis.
- g) La terapéutica de las enfermedades producidas por MNT se basa fundamentalmente en intervenciones quirúrgicas y en la administración de antibióticos (principalmente macrólidos), aunque la elección debe considerar al agente causal y si la enfermedad es localizada o diseminada.
- h) El empleo de antibióticos requiere de lapsos prolongados, es complicado y en ocasiones resulta inefectivo, debido a los altos índices de resistencia y a sus efectos adversos en los pacientes.
- i) Es necesario continuar estudiando e identificando a las diversas cepas de MNT ya que, además de seguir avanzando en el reconocimiento de un

número mayor de potenciales patógenos, podrán desarrollarse nuevas y mejores estrategias para el tratamiento y la profilaxis de las enfermedades implicadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbas, A. et Lichtman, A.**  
INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR  
5ª edición. España: Elsevier España, 2004: 351-355
2. **Abshire, R., Cockrum, P., Crider, J. y Schlech, B.:** Topical Antibacterial Therapy for Mycobacterial Keratitis: Potential for Surgical Prophylaxis and Treatment, *Clin Ther*, 2004; 26(2): 191-196.
3. **Amer, A. y Swanson, M.:** A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage, *Curr Opin Microbiol*, 2002; 5: 56-61.
4. **American College of Clinical Pharmacy**  
PHARMACOTHERAPY SELF-ASSESSMENT PROGRAM, INFECTIOUS DISEASES II.  
5ª edición. Londres, UK: ACCP, Softbound, 2005: 99-119.
5. **Bartos, M., Falkinham, O. y Pavlir, I.:** Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria – a review, *Vet Med-Czech*, 2004; 49(5): 161-170.
6. **Bartralot, R., García-Patos, V., Sitjas, D., Rodríguez-Cano, L., Mollet, J., Martín-Casabona, N., Coll, P., Castells, A. y Pujol, R.:** Clinical patterns of cutaneous nontuberculous mycobacterial infections, *Br J Dermatol*, 2005; 152: 727-734.
7. **Bermudez, L., Kolonoski, P., Petrofsky, M., Wu, M., Inderlied, C. y Young, L.:** Mefloquine, Moxifloxacin, and Ethambutol Are a Triple-Drug Alternative to Macrolide-Containing Regimens for Treatment of *Mycobacterium avium* Disease, *J Infect Dis*, 2003; 187: 1977-1980.
8. **Bishburg, E., Zucker M.J., Baran D.A. y Arroyo L.H.:** *Mycobacterium xenopi* infection after heart transplantation: An unreported pathogen, *Transplant Proc*, 2004; 36(9): 2834-2836.
9. **Blackwood, K., He, C., Gunton, J., Turenne, C., Wolfe, J. y Kabani, A.:** Evaluation of *recA* Sequences for Identification of *Mycobacterium* Species, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(8): 2846-2852.
10. **Bodmer, T., Miltner, E. y Bermudez, L.:** *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach; *FEMS Microbiol Lett*, 2000; 182: 45-49.

11. **Bråbäck, M., Riesbeck, K. y Forsgren, A.:** Susceptibilities of *Mycobacterium marinum* to Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Telithromycin, and Quinupristin-Dalfopristin (Synercid) Compared to Its Susceptibilities to Reference Macrolides and Quinolones, *Antimicrob Agents Chemother*, 2002; 46(4): 1114–1116.
12. **Brennan, M., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M. y Jacobs Jr., W.:** Evidence that Mycobacterial PE\_PGRS Proteins Are Cell Surface Constituents That Influence Interactions with Other Cells, *Infect Immun*, 2001; 69(12): 7326–7333.
13. **Briken, V., Porcelli, S., Besra, G. y Kremer, L.:** MicroReview, Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response, *Mol Microbiol*, 2004; 53(2): 391–403.
14. **Brown-Elliott, B. y Wallace Jr., R.:** Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria, *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15(4): 716–746.
15. **Broxmeyer, L., Sosnowska, D., Miltner, E., Chacón, O., Wagner, D., McGarvey, J., Barletta, R. y Bermudez, L.:** Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a Mycobacteriophage Delivered by a Nonvirulent Mycobacterium: A Model for Phage Therapy of Intracellular Bacterial Pathogens. *J Infect Dis*, 2002; 186: 1155–1160.
16. **Butler, W. R. y Guthertz, L.:** Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species, *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 704–726.
17. **Casanova, J-L.:** Mendelian susceptibility to mycobacterial infections, *Orphanet Encyclopedia*, 2003: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-bcgite.pdf>
18. **CDC Northern Territory**  
GUIDELINES FOR THE CONTROL OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN THE NORTHERN TERRITORY.  
EU: CDC, 2002: 4-18.
19. **Chamberlin, W., Graham, D., Hulten, K., El-Zimaity, H. M. T., Schwartz, M., Naser, S., Shafran, I. y El-Zaatari, F.:** *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease, *Aliment Pharmacol Ther*, 2001; 15(3): 337–346.

20. Chan, F., Knaak, T., Satkamp, L., Humbert, O., Falkow, S. y Ramakrishnan, L.: Complex pattern of *Mycobacterium marinum* gene expression during long-term granulomatous infection, *PNAS*, 2002; 99(6): 3920-3925.
21. Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, ZJ., Sun, LL., Shen, Y. y Jin, Q.: VFDB: a reference database for bacterial virulence factors, *Nucleic Acids Res*, 2005; 33(Database issue):D325-328
22. Chumann, G. y Möllmann, U.: Screening System for Xenosiderophores as Potential Drug Delivery Agents in *Mycobacteria*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45(5): 1317-1322.
23. Cloud, J., Neal, H., Rosenberry, R., Turenne, C., Jama, M., Hillyard, D. y Carroll, K.: Identification of *Mycobacterium* spp. by Using a Commercial 16S Ribosomal DNA Sequencing Kit and Additional Sequencing Libraries, *J Clin Microbiol*, 2002; 40(2): 400-406.
24. Collins, M., Lisby, G., Moser, C., Chicks, D., Christensen, S., Reichelderfer, M., Høiby, N., Harms, B., Thomsen, O., Skibsted, U., y Binder, V.: Results of Multiple Diagnostic Tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Patients with Inflammatory Bowel Disease and in Controls, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(12): 4373-4381.
25. Cosma, C., Sherman, D. y Ramakrish, L.: The Secret Lives of the Pathogenic *Mycobacteria*, *Annu Rev Microbiol*, 2003; 57: 641-676.
26. D LaMarca, B., Zhu, W., Arceneaux, J., Byers, R. y Lundrigan, M.: Participation of *fad* and *mbt* Genes in Synthesis of Mycobactin in *Mycobacterium smegmatis*, *J Bacteriol*, 2004; 186(2): 374-382.
27. Danelishvili, L., Poort, M. y Bermudez, L.: Identification of *Mycobacterium avium* genes up-regulated in cultured macrophages and in mice, *FEMS Microbiol Lett*, 2004; 239: 41-49.
28. Dao, D., Kremer, L., Guérardel, Y., Molano, A., Jacobs Jr., W., Porcelli, S. y Briken, V.: *Mycobacterium tuberculosis* Lipomannan Induces Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages, *Infect Immun*, 2004; 72(4): 2067-2074.
29. Dauendorffer, J., Guillemin, I., Aubry, A., Truffot-Pernot, C., Sougakoff, W., Jarlier, V. y Cambau, E.: Identification of *Mycobacterial* Species by PCR Sequencing of Quinolone Resistance-Determining Regions of DNA Gyrase Genes, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(3): 1311-1315.

30. de Mendonça-Lima, L., Picardeau, M., Raynaud, C., Rauzier, J., Goguet de la Salmonière, Y., Barker, L., Bigi, F., Cataldi, A., Gicquel, B. y Reyrat, J.: Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria, *Microbiology*, 2001; 147: 2315–2320.
31. Debacker, M., Aguiar, J., Steunou, C., Zinsou, C., Meyers, W., Guédénon, A., Scott, J., Dramaix, M. y Portaels, F.: *Mycobacterium ulcerans* Disease (Buruli Ulcer) in Rural Hospital, Southern Benin, 1997–200, *Emerg Infect Dis*, 2004; 10(8): 1391–1398.
32. Deepa, P., Therese, K. y Madhavan, H.: Application of PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) for the identification of mycobacterial isolates. *Indian J Med Res*, 2005, 121: 694–700.
33. Dobos, K., Spotts, E., Marston, B., Horsburgh Jr., R. y King, H.: Serologic Response to Culture Filtrate Antigens of *Mycobacterium ulcerans* during Buruli Ulcer Disease, *Emerg Infect Dis*, 2000; 6(2): 158–164.
34. Drobniewski, F., More, P. y Harris, G.: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacterial Liquid Cultures by Using Peptide Nucleic Acid-Fluorescence In Situ Hybridization Probes, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(1): 444–447.
35. Eddyani, M., Ofori-Adjei, D., Teugels, D., De Weirtdt, D., Boakye, D., Meyers, W. y Portaels, F.: Potential Role for Fish in Transmission of *Mycobacterium ulcerans* Disease (Buruli Ulcer): an Environmental Study, *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70(9): 5679–5681.
36. Eena, R., Ogi, J., Tephén S. y Yring, K. T.: Therapy of nontuberculous mycobacterial infections, *Dermatol Ther*, 2004; 17: 491–498.
37. El-Etr, S., Subbian, S., Cirillo, S. y Cirillo, J.: Identification of Two *Mycobacterium marinum* Loci That Affect Interactions with Macrophages, *Infect Immun*, 2004; 72(12): 6902–6913.
38. Etienne, G., Villeneuve, C., Billman-Jacobe, H., Astarie-Dequeker, C., Dupont, M. A. y Daffe, M.: The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*, *Microbiol*, 2002; 148(10): 3089–3100.
39. Euzéby, J.: List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature (LBSN), Actualizado al 13 de Julio de 2005. <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>
40. Falkinham III, J.: Factors Influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*, *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69(9): 5685–5689.

41. Falkinham III, J., Norton, C. D. y LeChevallier, M.: Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems, *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(3): 1225–1231.
42. Fattorini, L., Baldassarri, L., Li, Y., Ammendolia, M. G., Fan, Y., Recchia, S., Lona, E. y Orefici, G.: Virulence and drug susceptibility of *Mycobacterium celatum*, *Microbiol*, 2000; 146(11): p. 2733–2742.
43. Feng, Z. y Barletta, R.: Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-Alanine:D-Alanine Ligase and D-Alanine Racemase in the Mechanisms of Action of and Resistance to the Peptidoglycan Inhibitor D-Cycloserine, *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47(1): 283–291.
44. Forbes, B., Sahn, D., & Weissfeld, A.  
BAILEY & SCOTT DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO  
11ª edición. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 2004: 562-588.
45. Gao, L., Laval, F., Lawson, E., Groger, R., Woodruff, A., Morisaki, J., Cox, J., Daffe, M. y Brown, E.: Requirement for *kasB* in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy, *Mol Microbiol*, 2003; 49(6): 1547–1563.
46. Geijtenbeek, T., van Vliet, S., Koppel, E., Sánchez-Hernández, S., Vandenbroucke-Grauls, C., Appelmelk, B. y van Kooyk, Y.: Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function, *J Exp Med*, 2003; 197(1): 2003 7–17.
47. Gómez, A., Mve-Obiang, A., Vray, B., Rudnicka, W., Shamputa, I., Portaels, F., Meyers, W., Fonteyne, P. y Realini, L.: Detection of Phospholipase C in Nontuberculous Mycobacteria and Its Possible Role in Hemolytic Activity, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(4): 1396–1401.
48. Gordon, M., Wilson, H., Duthie, F., Jones, B. y Field, M. When typical is atypical: mycobacterial infection mimicking cutaneous vasculitis, *Rheumatology* (2002); 41: 685–690.
49. Greenwell-Wild, T., Vázquez, N., Sim, D., Schito, M., Chatterjee, D., Orenstein, J. y Wahl, S.: *Mycobacterium avium* Infection and Modulation of Human Macrophage Gene Expression, *J Immunol*, 2002; 169: 6286–6297.
50. Guérardel, Y., Maes, E., Briken, V., Chirat, F., Leroy, Y., Locht, C., Strecker, G. y Kremer, L.: Lipomannan and Lipoarabinomannan from a Clinical Isolate of *Mycobacterium kansasii*. Novel structural features and apoptosis-inducing properties, *J Biol Chem*, 2003; 278(38): 36637–36651.

51. **Hale, Y., Pfyffer, G. y Salfinger, M.:** Laboratory Diagnosis of Mycobacterial Infections: New Tools and Lessons Learned, CID, 2001; 33: 834-846.
52. **Hardman, J., Limbird, L., Gilman, A.**  
GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS.  
10ª edición. E.U.: Mc. Graw-Hill, 2001: 1179-1183, 1250-1254, 1285-1291, 1274-1283.
53. **Hazra, R., Floyd, M., Sloutsky, A., y Husson, R.:** Novel Mycobacterium Related to *Mycobacterium triplex* as a Cause of Cervical Lymphadenitis, J Clin Microbiol, 2001; 39(4): 1227-1230.
54. **Heckman, G., Hawkins, C., Morris, A., Burrows, L. y Bergeron, C.:** Rapidly Progressive Dementia Due to *Mycobacterium neoaurum* Meningoencephalitis, Emerg Infect Dis, 2004; 10(5): 924-927.
55. **Holland, S.:** Immunotherapy of Mycobacterial Infections, Semin Respir Infect, 2001; 16(1): 47-59.
56. **Holland, S.:** Nontuberculous Mycobacteria, Am J Med Sci, 2001; 321(1): 49-55.
57. **Holr J., Krieg N., Sneath P., Staley J. y Williams S.**  
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.  
9ª edición. E.U.: Williams Wilkins, 1994: 597-603
58. **Hongmanee, P., Stender, H. y Rasmussen, O.:** Evaluation of a Fluorescence In Situ Hybridization Assay for differentiation between Tuberculous and Nontuberculous *Mycobacterium* Species in Smears of Lowenstein-Jensen and Mycobacteria Growth Indicator Tube Cultures Using Peptide Nucleic Acid Probes, J Clin Microbiol, 2001; 39(3): 1032-1035.
59. **Howard, S., Byrd, T. y Lyons, C.:** A polymorphic region in *Mycobacterium abscessus* contains a novel insertion sequence element, Microbiology, 2002; 148: 2987-2996
60. **Jeevarajah, D., Patterson, J. H., Taig, E., Sargeant, T., McConville, M. J. y Billman-Jacobe, H.:** Methylation of GPLs in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*, J Bacteriol, 2004; 186(20): 6792-6799.
61. **Kane, C., Vincent, A., Greene, J. y Sandin, R.:** Disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection, Cancer Control, 2000; 7(2): 181-184.



62. **Katoch, V.M.:** Review Article Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM), *Indian J Med Res*, 2004; 120: 290-304.
63. **Klein, J., Brown, T. y French, G.:** Rifampin Resistance in *Mycobacterium kansasii* Is Associated with *rpoB* Mutations, *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45(11): 3056–3058.
64. **Koppel, E., Ludwig, I., Sánchez, M., Lowary, T., Gadikota, R., Tuzikov, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van Kooyk, Y., Appelmelk, B. y Geijtenbeek, T.:** Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1, *Immunobiol*, 2004; 209: 117–127.
65. **Lachnik, J., Ackermann, B., Bohrsen, A., Maass, S., Diephaus, C., Puncken, A., Stermann, M. y Bange, F.:** Rapid-Cycle PCR and Fluorimetry for Detection of Mycobacteria, *J Clin Microbiol*, 2002; 40(9): 3364–3373.
66. **Lee, H., Park, H., Cho, S., Bai, G. y Kim, S.:** Species Identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the *rpoB* Gene, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(8): 2966–2971.
67. **Lefmann, M., Honisch, C., Böcker, S., Storm, N., von Wintzingerode, F., Schlötterburg, C., Moter, A., van den Boom, D. y Göbel, U.:** Novel Mass Spectrometry-Based Tool for Genotypic Identification of Mycobacteria, *J Clin Microbiol*, 2004, 42(1): 339–346.
68. **Li, X., Zhang, L. y Nikaido, H.:** Efflux Pump-Mediated Intrinsic Drug Resistance in *Mycobacterium smegmatis*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; 48(7): 2415–2423.
69. **Livermore, D.:** Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum, *J Antimicrob Chemother*, 2003; 51(S2): ii9-ii16.
70. **MacFaddin J.**  
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA.  
3ª edición. Argentina: Médica Panamericana, 2003: 82, 333, 503-504.
71. **Maeda, N., Nigou, J., Hermann, J., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P., Puzo, G., Gicquel, B. y Neyrolles, O.:** The Cell Surface Receptor DC-SIGN Discriminates between *Mycobacterium* Species through Selective Recognition of the Mannose Caps on Lipoarabinomannan, *J Biol Chem*, 2003; 278(8): 5513–5516.

72. **Manganelli, R., Fattorini, L., Tan, D., Iona, E., Orefici, G., Altavilla, G., Cusatelli, P. y Smith, I.:** The Extra Cytoplasmic Function Sigma Factor  $\sigma E$  Is Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Virulence in Mice, *Infect Immun*, 2004; 72(5): 3038–3041.
73. **Marques, T., Ribeiro, J., Chagas, Q., Pereira, C., Roxo, E., Cardoso, S., Rodrigues, L. y Sampaio, P.:** Virulent *Mycobacterium fortuitum* Restricts NO Production by a Gamma Interferon-Activated J774 Cell Line and Phagosome-Lysosome Fusion, *Infect Immun*, 2002; 70(10): 5628–5634.
74. **McNerney R. y Traoré, H.:** A REVIEW Mycobacteriophage and their application to disease control, *J Appl Microbiol*, 2005; 99(2): 223-233
75. **Montero, C., Mateu, G., Rodríguez, R. y Takiff, H.:** Intrinsic Resistance of *Mycobacterium smegmatis* to Fluoroquinolones May Be Influenced by New Pentapeptide Protein MfpA, *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45(12): 3387–3392.
76. **Morszeck, C., Berger, S. y Plum G.:** The macrophage-induced gene (*mig*) of *Mycobacterium avium* encodes a medium-chain acyl-coenzyme A synthetase, *Biochem Biophys Acta*, 2001; 1521: 59-65.
77. **Mueller-Ortiz, S, Wanger, A. y Norris, S.:** Mycobacterial Protein HbhA Binds Human Complement Component C3, *Infect Immun*, 2001; 69(12): 7501–7511.
78. **Murcia-Aranguren, M., Gómez-Marín, J., Alvarado, F., Bustillo, J., de Mendivelson, E., Gómez, B., León, C., Triana, W., Vargas, E. y Rodríguez, E.:** Frequency of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in HIV infected patients from Bogota, Colombia, *BMC Infect Disea*, 2001; 1:21 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/21>
79. **Nash, K.:** Intrinsic Macrolide Resistance in *Mycobacterium smegmatis* Is Conferred by a Novel *erm* Gene, *erm(38)*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47(10): 3053–3060.
80. **Newton, G., Koledin, T., Gorovitz, B., Rawat, M., Fahey, R. y Av-Gay, Y.:** The Glycosyltransferase Gene Encoding the Enzyme Catalyzing the First Step of Mycothiol Biosynthesis (*mshA*), *J Bacteriol*, 2003; 185(11): 3476–3479.
81. **Niederweis, M.:** MicroReview Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes, *Molec Microbiol*, 2003; 49(5): 1167–1177

82. **Organización Mundial de la Salud, 57ª Asamblea Mundial de la Salud.** Vigilancia y control de la enfermedad causada por *Mycobacterium ulcerans* (úlceras de Buruli), Documentación Asamblea Mundial de la Salud, 2004; A57/5: 1-5.
83. **Palenque, E.:** Skin disease and nontuberculous atypical mycobacteria, *Int J Dermat*, 2000; 39: 659-666.
84. **Pedley, S., Bartram, J., Rees, G., Dufour, A. y Cotruvo, J.** PATHOGENIC MYCOBACTERIA IN WATER: A GUIDE TO PUBLIC HEALTH CONSEQUENCES, MONITORING AND MANAGEMENT. Londres, UK: World Health Organization-IWA Publishing, 2004: 95-130.
85. **Phillips, M. y von Reyn, C.F.,** Nosocomial Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria, *CID*, 2001; 33: 1363-1374.
86. **Primm, T., Lucero, C. y Falkinham III, J.:** Health Impacts of Environmental Mycobacteria, *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17(1): 98-106.
87. **Rawat, M., Kovacevic, S., Billman-Jacobe, H. y Av-Gay, Y.:** Inactivation of *mshB*, a key gene in the mycothiol biosynthesis pathway in *Mycobacterium smegmatis*, *Microbiology*, 2003; 149: 1341-1349.
88. **Raynaud, C., Guilhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganelli, R., Smith, I., Gicquel, B. y Jackson, M.:** Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol Microbiol*, 2002; 45(1): 203-217.
89. **Roth, A., Reischl, U., Schönfeld, N., Naumann, L., Emler, S., Fischer, M., Mauch, H., Loddenkenoer, R. y Kroppenstedt, R.:** *Mycobacterium heckeshornense* sp. nov., a New Pathogenic Slowly Growing *Mycobacterium* sp. Causing Cavitory Lung Disease in an Immunocompetent Patient, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(11): 4102-4107.
90. **Saavedra, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L. y López-Marín, L.:** Mycobacterial Di-O-Acyl-Trehalose Inhibits Mitogen- and Antigen-Induced Proliferation of Murine T Cells In Vitro, *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001; 8(6): 1081-1088.
91. **Saggese, D., Compadretti, G. y Burnelli, R.:** Nontuberculous Mycobacterial Adenitis in Children: Diagnostic and Therapeutic Management, *Am J Otolaryngol*, 2003; 24: 79-84.
92. **Sander, P., Belova, L., Kidan, Y. G., Pfister, P., Mankin, A. S. y Böttger, E. C.:** Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations, *Molec Microbiol*, 2002; 46(5): 1295-1304

93. **Sanguinetti, M., Ardito, F., Fiscarelli, E., La Sorda, M., D'Argenio, P., Ricciotti, G. y Fadda, G.:** Fatal Pulmonary Infection Due to Multidrug-Resistant *Mycobacterium abscessus* in a Patient with Cystic Fibrosis, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(2): 816–819.
94. **Shamputa, I., Rigouts, L. y Portaels, F.:** Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens, *APMIS*, 2004; 112: 728–752.
95. **Shrestha, N., Tuohy, M., Hall, G., Reischl, U., Gordon, S. y Procop, G.:** Detection and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacterial Isolates by Real-Time PCR, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(11): 5121–5126.
96. **Smole, S. C., McAleese, F., Ngampasutadol, J., Fordham von Reyn, C. y Arbeit, R. D.,** Clinical and Epidemiological Correlates of Genotypes within the *Mycobacterium avium* Complex Defined by Restriction and Sequence Analysis of *hsp65*, *J Clin Microbiol*, 2002; 40(9): 3374–3380.
97. **Snyder, S. y Small, P.L.C.:** Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Mycobacterium ulcerans*, *Microb Pathog*, 2003; 34: 91–101.
98. **Soini, H. y Musser, J.:** Molecular Diagnosis of Mycobacteria, *Clin Chem*, 2001; 47(5): 809–814.
99. **Stamm, L. y Brown, E.:** *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium, *Microbes Infect*, 2004; 6: 1418–1428.
100. **Stephan, J., Mailaender, C., Etienne, G., Daffé, M. y Niederweis, M.:** Multidrug Resistance of a Porin Deletion Mutant of *Mycobacterium smegmatis*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; 48(11): 4163–4170.
101. **Stewart, G., Wernisch, L., Stabler, R., Mangan, J., Hinds, J., Laing, K., Young, D. y Butcher, P.:** Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays, *Microbiology*, 2002; 148: 3129–3138.
102. **Stinear, T., Hong, H., Frigui, W., Pryor, M., Brosch, R., Garnier, T., Leadlay, P. y Cole, S.:** Common Evolutionary Origin for the Unstable Virulence Plasmid pMUM Found in Geographically Diverse Strains of *Mycobacterium ulcerans*, *J Bacteriol*, 2005; 187(5): 1668–1676.

103. Stinear, T., Jenkin, G., Johnson, P. y Davies, J.: Comparative Genetic Analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* Reveals Evidence of Recent Divergence, *J Bacteriol*, 2000; 182(22): 6322–6330.
104. Stinear, T., Mve-Obiang, A., Small, P., Frigui, W., Pryor, M., Brosch, R., Jenkin, G., Johnson, P., Davies, J., Lee, R., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S., Leadlay, P. y Cole, S.: Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*, *PNAS*, 2004; 101(5): 1345–1349
105. Stokes, R., Norris-Jones, R., Brooks, D., Beveridge, T., Doxsee, D. y Thorson, L.: The Glycan-Rich Outer Layer of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis* Acts as an Antiphagocytic Capsule Limiting the Association of the Bacterium with Macrophages, *Infect Immun*, 2004; 72(10): 5676–5686.
106. Suomalainen, S., Koukila-Kähkölä, P., Brander, E., Katila, M., Piilonen, A., Paulin, L. y Mattson, K.: Pulmonary Infection Caused by an Unusual, Slowly Growing Nontuberculous Mycobacterium, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(7): 2668–2671.
107. Theodorou, D., Theodorou, S., Kakitsubata, Y., Sartoris, D. y Resnick, D.: Imaging Characteristics and Epidemiologic Features of Atypical Mycobacterial Infections Involving the Musculoskeletal System, *AJR*, 2001; 176: 341-349.
108. Toronto Public Health: Acupuncture and *Mycobacterium abscessus*, *Communiqué*, 2003; 3: 1, 4.
109. Tortoli, E.: Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s, *Clin Microbiol Rev*, 2003; 16(2): 319–354.
110. Tortoli, E., Nanetti, A., Piersimoni, C., Cichero, P., Farina, C., Mucignat, G., Scarparo, C., Bartolini, L., Valentini, R., Nista, D., Gesu, G., Passerini C., Crovatto, M. y Brusarosco, G.: Performance Assessment of New Multiplex Probe Assay for Identification of Mycobacteria, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(3): 1079–1084.
111. Tran, T., Saheba, E., Arcerio, A. V., Chávez, V., Li, Q., Martinez, L. y Primm, T.: Quinones as antimycobacterial agents, *Bioorg Med Chem*, 2004; 12: 4809–4813.

112. Tu, H., Chang, S., Huaug, T., Huaug, W., Liu, Y. y Lee, S.: Microscopic Morphology in Smears Prepared from MGIT Broth Medium for Rapid Presumptive Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium kansasii*, *Ann Clin Lab Sci*, 2003; 33: 179-183.
113. Turenne, C., Suchak, A., Wolfe, J., Kabani, A. y Nicolle, L.: Soft Tissue Infection Caused by a Novel Pigmented, Rapidly Growing *Mycobacterium* Species, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(6): 2779–2782.
114. Tzen, C., Chen, T., Wu, T., Yong, D. y Lee, H.: Disseminated cutaneous infection with *Mycobacterium kansasii*: Genotyping versus phenotyping, *J Am Acad Dermatol*, 2001; 45: 620-624.
115. Vignal, C., Guérardel, Y., Kremer, L., Masson, M., Legrand, D., Mazurier, J. y Ellass, E.: Lipomannans, But Not Lipoarabinomannans, Purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* Induce TNF- $\alpha$  and IL-8 Secretion by a CD14-Toll-Like Receptor 2-Dependent Mechanism, *J Immunol*, 2003; 171: 2014–2023.
116. Villeneuve, C., Etienne, G., Abadie, V., Montrozier, H., Bordier, C., Laval, F., Daffe, M., Maridonneau-Parini, I. y Astarie-Dequeker, C.: Surface-exposed Glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* Specifically Inhibit the Phagocytosis of Mycobacteria by Human Macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids, *J Biol Chem*, 2003; 278(51): 51291–51300.
117. Volkman, H., Clay, H., Beery, D., Chang, J., Sherman, D. y Ramakrishnan, L.: Tuberculous Granuloma Formation Is Enhanced by a *Mycobacterium* Virulence Determinant, *PLoS Biol*, 2004; 2(11): 1946-1956
118. Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry III, C., Bentrup, K., Russell, D. y Bermudez, L.: Elemental Analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-Containing Phagosomes Indicates Pathogen-Induced Microenvironments within the Host Cell's Endosomal System, *J Immunol*, 2005; 174: 1491–1500
119. Wagner, D., Sangari, F., Parker, A. y Bermudez, L.: *fecB*, a gene potentially involved in iron transport in *Mycobacterium avium*, is not induced within macrophages, *FEMS Microbiol Lett*, 2005; 247(2): 185-191.

120. Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G. y Pieters, J.: Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival Within Macrophages, *Science*, 2004; 304: 1800-1804.
121. Watterson, S. y Drobniowski, F.: Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections, *J Clin Pathol*, 2000; 53: 727-732.
122. Woods, G.: Susceptibility Testing for Mycobacteria, *CID*, 2000; 31: 1209-1215.
123. Yang, S., Hsueh, P., Lai, H., Teng, L., Huang, L., Chen, J., Wang, S., Shie, D., Ho, S. y Luh, K.: High Prevalence of Antimicrobial Resistance in Rapidly Growing Mycobacteria in Taiwan, *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47(6): 1958-1962.
124. Zelazny, A., Calhoun, L., Li, L., Shea, Y. y Fischer, S.: Identification of *Mycobacterium* Species by *secA1* Sequences, *J Clin Microbiol*, 2005; 43(3): 1051-1058.

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
ACP*	Proteína transportadora de grupos acilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATS*	Sociedad Torácica Americana
BAAR	Bacilos alcohol ácido resistentes
CaM	Calmodulina
CaMKII*	Proteincinasa II dependiente de calmodulina
CCF	Cromatografía en capa fina
CD	Grupo de diferenciación
CGL	Cromatografía gas-líquido
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DC-SIGN	Receptor de la célula dendrítica lectina específico tipo-C
dUTP	Desoxiuridin trifosfato
EEA1*	Early endosomal antigen 1
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FISH*	Hibridación in situ fluorescente
FL-CLAR	CLAR que utiliza fluorescencia
FRET*	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
g	Gramos
GM-CSF*	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
GPL	Glicopeptidolípidos
h	Horas
HAART*	Terapia antirretroviral altamente activa
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
ITS*	Espaciadores internos que se transcriben
i.v.	Intravenosa
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramos
LAMs	Lipoarabinomanana
LMs	Lipomanana

\* por sus siglas en inglés



MAC*	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
ManLAMs	Lipoarabinomanana con residuos de manosa
MCR	Micobacterias de crecimiento rápido
mg	Miligramos
MIC*	Concentración mínima inhibitoria
mL	Mililitro
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MOTT	Mycobacteria other than tubercle bacilli
MR*	Receptor de manosa
NCCLS*	Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico
nm	Nanómetros
PANs	Péptidos de ácidos nucleicos
PGE1	Prostaglandina E1
pb	Pares de bases
PBP*	Proteínas de unión a penicilinas
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa
PILAM*	Lipoarabinomanana con fosfoinositol
PIM <sub>2</sub> *	Fosfatidil- <i>myo</i> -inositol dimanósido
PI3K*	Fosfoinositol-3-cinasa
PI3P*	Fosfoinositol-3-fosfato
Pkn	Serin/treonin protein cinasas
Plc*	Fosfolipasa
PPD-T*	Derivado proteico purificado de <i>M. tuberculosis</i>
QRDRs*	Regiones que determinan la resistencia a quinolonas
RD1	Región de diferencia 1
Rf*	Factor de retención
RFLP*	Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
SC	Semicuantitativa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SOD	Superóxido dismutasa
TCH*	Hidrazida del ácido tiofen-2-carboxílico
TE	Termoestable a 68°C
TLR*	Receptores tipo toll
TMP-SMX	Trimetoprim-sulfametoxazol
TNF- $\alpha$ *	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV-CLAR	CLAR que utiliza absorción al UV

\*por sus siglas en inglés