

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**SOBRE MECANISMOS DE RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA Y DESARROLLO DE
BIOPELÍCULAS EN SU RELACIÓN CON LA
PATOGENICIDAD DE LAS MICOBACTERIAS NO
PIGMENTADAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Nieves Zamora y Martín de Hijas

Bajo la dirección del doctor

Jaime Esteban Moreno

Madrid, 2012

**SOBRE MECANISMOS DE RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA Y DESARROLLO DE
BIOPELÍCULAS EN SU RELACIÓN CON LA
PATOGENICIDAD DE LAS
MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS DE
CRECIMIENTO RÁPIDO.**

Tesis Doctoral presentada por:

NIEVES ZAMORA Y MARTÍN DE HIJAS

Director de la Tesis:

Dr. JAIME ESTEBAN MORENO

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I

PUBLICACIONES ORIGINALES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS RELACIONADOS CON LA TESIS.

PUBLICACIONES.

- * Esteban J, Fernández Roblas R, García Cía JI, **Zamora N** , Ortiz A. Clinical Significance and Epidemiology of Non-Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria in a University Hospital. *Journal of Infection*. 2007. 54: 135-145. Journal Impact Factor: 2,037
- * Esteban J, **Zamora N** , Ortiz A, Kinnari TJ. Recent developments in the study of pathogenesis of infections due to non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Current Trends in Microbiology*. 2006. 2: 32-39.
- * **Zamora N**, Esteban J, Kinnari T, Celdran A, Granizo JJ, Zafra C. In vitro evaluation of the attachment to polypropylene sutures on non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007. 13: 902-907. Journal Impact Factor: 3,254.
- * Esteban J, **Zamora N** , Ortiz A. Use of molecular techniques for epidemiological typing of rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006. 12: 943-944. Journal Impact Factor: 3,254.
- * Ortiz A, Esteban J, **Zamora N** . Molecular identification by random amplified polymorphic DNA analysis of a pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* due to cross-contamination of clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*. 2007. 56: 871-872. Journal Impact Factor: 2,180.
- * Esteban J, **Martín de Hijas NZ**, Fernández AI, Fernández Roblas R, Gadea I, Madrid Study Group of Mycobacteria. Epidemiology of infections due to Non-pigmented Rapidly Growing Mycobacteria diagnosed in an urban area. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. En prensa. Journal Impact Factor: 2,330.
- * **Martín de Hijas NZ**, Fernández Roblas R, Fernández Martínez AI, Gadea I, **Esteban J**. Usefulness of E-test to Study Tigecycline susceptibility for Non-Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.04.016. Journal Impact Factor: 2,221.
- * Fernández Roblas R, **Martín de Hijas NZ**, Fernández Martínez AI, García Almeida D, Gadea I, Esteban J. In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008. Published ahead of print on 25 August 2008, doi:10.1128/AAC.00695-08. Journal Impact Factor: 4,390.
- * Esteban J, **Martín de Hijas NZ**, Kinnari TJ, Ayala G, Fernandez Roblas R, Gadea I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiology*. 2008. 8: 184. doi:10.1186/1471-2180-8-184 Journal Impact Factor: 2,982.
- * Esteban J, **Martín de Hijas NZ** , García Almeida D, Bodas Sanchez A, Gadea I, Fernandez Roblas R. Role of *erm* methylase genes in the phenotypic resistance to macrolides among clinical isolates of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. En prensa. Journal Impact Factor: 2,980.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS. COMUNICACIONES ORALES.

* 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Munich 2007)

* Differences in biofilm development by non-pigmented rapidly growing mycobacteria using different culture media. J. Esteban, **N. Zamora**, R. Fernandez Roblas, I. Gadea, H. Adames, T.J. Kinnari.

* Infections due to non-pigmented rapidly growing mycobacteria in Madrid, 2005. J. Esteban, **N. Zamora**, L. Fernández, I. Gadea, J. Cacho, R. Cias, R. Daza, D. Domingo, J. García, D. García de Viedma, E. Gómez-Mampaso, E. Palenque, M.J. Ruiz-Serrano.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS. POSTERS.

* XII Congreso de la SEIMC (Valencia 2006).

* Evaluación in vitro de la capacidad de adherencia a suturas de polipropileno en micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. **Zamora N**, Esteban J, Celdrán A, Granizo JJ, Ortiz A, Zafra C, Fernández Alonso ML.

* 12^a Reunion del Grupo Español de Micobacteriología (Pamplona 2006).

* Caracterización molecular mediante RAPD de un pseudobrote de *Mycobacterium fortuitum* debido a contaminación cruzada de los cultivos. Ortiz A, **Zamora N**, Esteban J, Fernández Roblas R, Gadea I.

* XIII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (Toledo 2007).

* Presencia de genes de resistencia a macrólidos en micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. **N. Zamora Martín de Hijas**, A.I. Fernández Martínez, D. García Almeida, R. Fernández Roblas, I. Gadea Gironés, J. Esteban Moreno.

* XIII Congreso de la SEIMC (Madrid, 2008).

* Detección de genes de resistencia a macrólidos y correlación con la resistencia fenotípica en micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. **Martín de Hijas NZ**; García Almeida D; Bodas Sánchez A; Fernández Roblas R.; Gadea I; Esteban J; Grupo de Estudio de Micobacterias de Madrid.

* Relación entre la movilidad y la capacidad de desarrollar biofilm en micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. García Almeida D, **Martín**

de Hijas NZ, Celdrán A, Fernández Roblas R, Gadea I, Esteban J.

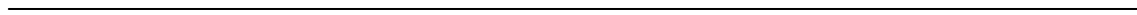
* Estudio *in vitro* sobre la penetración de amicacina, claritromicina y ciprofloxacino en biofilms de *Mycobacterium abscessus*. **Martín de Hijas NZ** ; Gadea I; Celdrán, Á, García Almeida D; Fernandez Roblas R, Bodas Sánchez A, Esteban J.

* Sensibilidad *in vitro* de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido a tigeciclina y otros 10 antimicrobianos. Fernández Roblas, R, **Martín de Hijas NZ**; Fernandez Martínez AI; García Almeida D; Gadea I; Esteban J.

* Evaluación de la técnica de E-test para el estudio de sensibilidad a tigeciclina en micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. **Martín de Hijas, NZ**; Fernández Roblas R, Fernandez Martínez AI; García Almeida D; Gadea I; Esteban J.

* 29th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology (Plovdiv, 2008)

* Biofilm development by non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **Martin-de-Hijas NZ**, Garcia-Almeida D, Gadea I, Ayala G, Fernandez Roblas R, Celdran A, Gómez Barrena E, Esteban J.





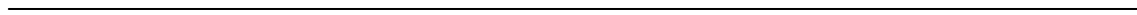
ÍNDICE

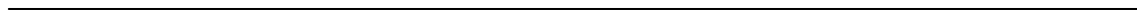
INTRODUCCIÓN.....	23
LAS MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO.....	25
CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	27
EPIDEMIOLOGÍA DE LAS MNPCR.....	28
ENFERMEDADES CAUSADAS POR MNPCR	30
TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO	35
MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA.....	37
BIOPELÍCULAS	40
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
MICOBACTERIAS EMPLEADAS EN LOS ESTUDIOS.....	57
Cepas de colección.....	57
Cepas clínicas.....	57
Caracterización de los aislamientos clínicos	58
SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS AISLAMIENTOS	61
DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS AISLAMIENTOS.....	62
Evaluación de la velocidad de crecimiento	62
Determinación del fenotipo de las colonias	62
ESTUDIO DE SENSIBILIDAD MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	63
Antibióticos.....	63
Estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).....	63
DETECCIÓN DE GENES DE LAS METILASAS <i>erm</i>	65
Extracción de ADN.....	65
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	65
Electroforesis	66
Secuenciación del amplicón	67
Análisis estadístico	67
DETECCIÓN DEL GEN <i>IfrA</i>	68
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	68
Electroforesis	69
Secuenciación.....	69

DETECCIÓN DEL GEN <i>tap</i>	70
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	70
Electroforesis	71
Secuenciación.....	71
ESTUDIO DE ADHERENCIA A BIOMATERIALES	72
Medio de crecimiento y condiciones de incubación	72
Evaluación de la adherencia.....	72
Análisis estadístico	74
TÉCNICA DE DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	75
Análisis de los datos	76
Análisis estadístico	76
ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE MNPCR Y SU CORRELACIÓN CON LA MOVILIDAD, EL FENOTIPO DE LA COLONIA Y EL SIGNIFICADO CLÍNICO	78
Presencia de contaminaciones.....	78
Microscopía confocal láser	78
Análisis estadístico	79
ESTUDIO DE MOVILIDAD POR DESLIZAMIENTO	80
DETECCIÓN DEL GEN <i>groEL</i> EN MNPCR	81
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	81
Electroforesis	82
Secuenciación.....	82
EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN ANTIBIÓTICA EN LAS BIOPELÍCULAS.....	83
RESULTADOS	87
SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS AISLAMIENTOS	89
ESTUDIO DE SENSIBILIDAD MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	92
DETECCIÓN DE GENES DE LAS METILASAS <i>erm</i>	96
GENES DE BOMBAS DE EFLUJO ACTIVO.....	103
ESTUDIO DE ADHERENCIA.....	111
TÉCNICA DE DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MNPCR Y EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DEL MEDIO DE CULTIVO	115
ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE MNPCR	122
DETECCIÓN DEL GEN <i>groEL</i> EN MNPCR	131
EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN ANTIBIÓTICA EN LAS BIOPELÍCULAS.....	132

DISCUSIÓN.....	141
CONCLUSIONES.....	167
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXO	197







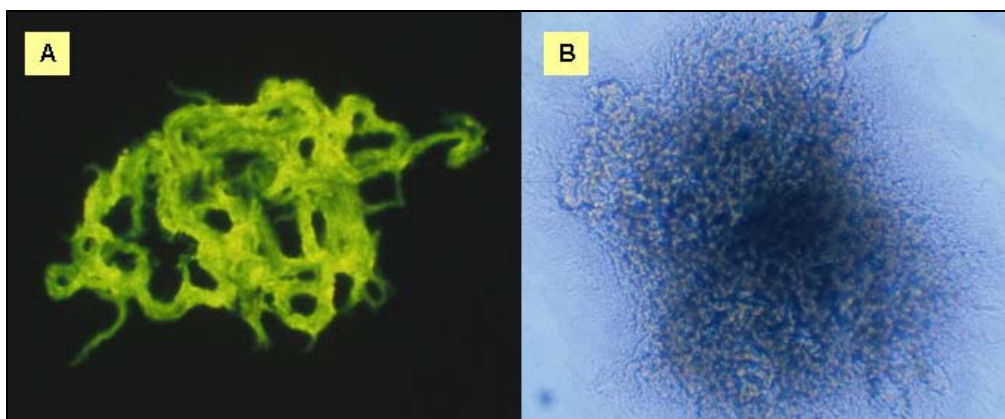
INTRODUCCIÓN



LAS MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Desde que en 1896 fue definido el género *Mycobacterium* por Lehmann y Neumann ¹⁹³, el número de nuevas especies descritas englobadas en el mismo no ha dejado de crecer. El género *Mycobacterium* incluye en la actualidad unas ciento treinta y tres especies bien caracterizadas ¹¹⁰. Dentro de este pequeño género y por motivos históricos, clínicos y epidemiológicos, los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y muy especialmente la especie tipo *M. tuberculosis* (Figura 1) descrita por Robert Koch en 1882 ¹⁸⁰, son las especies más estudiadas. Posteriormente al descubrimiento de *M. tuberculosis*, se empezaron a describir nuevas especies con características similares, incluyendo la capacidad de ser ácido-alcohol resistentes, fenómeno observado mediante la tinción de Zeel-Nielsen ^{23,36,99,332}.

Figura 1. *Mycobacterium tuberculosis*.



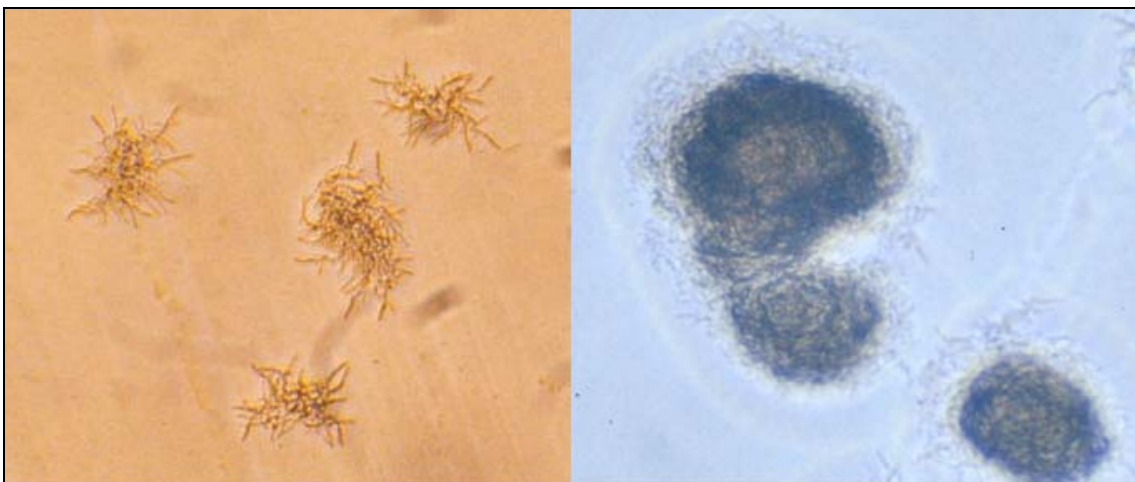
A: *M. tuberculosis* en cultivo Bactec, tinción de auramina. B: *M. tuberculosis* en medio Middlebrook, microcolonia.

Muchos de estos organismos eran *Bacteria* ambientales, rara vez descritas como patógenos en humanos, que fueron englobadas dentro de las

denominadas micobacterias “atípicas” o “no tuberculosas”. Con los años en este grupo de micobacterias, se han descrito cada vez más especies", siendo estudiadas por su papel, demostrado, como causantes de enfermedad humana ^{36,74,336,354,355}, máxime cuando cada vez hay más pacientes con factores de riesgo ⁷⁷ para la enfermedad causada por estas micobacterias.

Dentro de las micobacterias atípicas se engloban las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR), objeto del presente estudio y que poseen diferentes características, aunque tienen en común que ninguna tiene pigmentación y todas dan lugar a colonias macroscópicamente visibles en menos de siete días ^{36,293,347}. Son organismos conocidos desde los últimos años del siglo XIX ²³ y primera mitad del siglo XX, cuando la especie *Mycobacterium fortuitum* (Figura 2) fue descrita como causante de infecciones en humanos ^{23,74}.

Figura 2. *Mycobacterium fortuitum* en Middlebrook 7H11.



En la actualidad se conocen más de veinte especies distintas de MNPCR,

algunas de ellas descritas como causantes de infecciones en humanos (Cuadro 1) ^{2,36,38}. Estos organismos tienen características comunes ^{36,77} que hacen que el grupo sea de especial interés en la patología humana, por el amplio espectro de enfermedades que pueden causar, las diferencias en el tratamiento en comparación con *M. tuberculosis* y otras micobacterias, y muchas otras características que son las diferencian claramente de los de los demás miembros del género ^{36,321,347}.

Cuadro 1. MNPCR con interés clínico descritas.

Especie	
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium houstonense</i>
<i>Mycobacterium alvei</i>	<i>Mycobacterium immunogenum</i>
<i>Mycobacterium boenickei</i>	<i>Mycobacterium mageritense</i>
<i>Mycobacterium brisbanense</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium brumae</i>	<i>Mycobacterium neworleansense</i>
<i>Mycobacterium canariasense</i>	<i>Mycobacterium peregrinum</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium porcinum</i>
<i>Mycobacterium conceptionense</i>	<i>Mycobacterium senegalense</i>
<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	<i>Mycobacterium septicum</i>
<i>Mycobacterium elephantis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium wolinskyi</i>
<i>Mycobacterium goodii</i>	

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

En los últimos años y con el auge de la Biología Molecular, el número de especies pertenecientes a las MNPCR ha ido en aumento ^{2,15,36,57,86,171,185,286,287,292,300,351}, así como las reclasificaciones de las ya existentes, dificultando su caracterización por parte de los laboratorios de micobacteriología clínica. Clásicamente, la identificación de las especies se

realizaba mediante una batería de pruebas bioquímicas y unas determinadas características fenotípicas ^{10,23,212,226,293}. Actualmente el número de pruebas bioquímicas necesarias es mucho mayor, algunas muy poco frecuentes, ³⁶ y deben ser complementadas en la mayoría de los casos con técnicas moleculares basadas en el ADN. Las sondas específicas y otras técnicas de amplificación genética son instrumentos imprescindibles para la correcta identificación de las especies ^{93,218}. Dentro de las técnicas moleculares podemos destacar la secuenciación del gen que codifica para el 16s ARN y el *PCR-RFLP Analysis* (PRA). Esta última técnica se basa en la amplificación de regiones de genes comunes (fragmentos de los genes *hsp65*, *rpoB*, o 16S-23S ARN ribosómico [ARNr]) dentro del género *Mycobacterium*, que presentan polimorfismos, de manera que el posterior corte con enzimas de restricción específicas hace que cada patrón sea único de una especie concreta ^{42,75,76,82,153,178,274,301,314,356}. Esta técnica es, junto con la secuenciación de fragmentos específicos del ADN cromosómico, la técnica más empleada para la identificación de micobacterias ^{36,318}.

EPIDEMIOLOGÍA DE LAS MNPCR

A pesar de su frecuencia y de su innegable potencial patógeno ¹⁵⁴, las infecciones causadas por las MNPCR no son de declaración obligatoria y por tanto existen muy pocos datos sobre su incidencia real. En algunos estudios hasta un tercio de los aislamientos se pueden considerar clínicamente significativos, si bien esto depende de la muestra en que se aísla la micobacteria ¹⁰⁰. Las MNPCR son bacterias ambientales cuyo hábitat

puede ser, entre otros lugares, el suelo o en el agua, incluyendo los sistemas de abastecimiento de la misma ^{36,60,157,288,324,343}. Existe un amplio espectro de estudios sobre la presencia de micobacterias en estos sistemas, incluyendo el aislamiento de MNPCR ^{52,60,112,191,324}, aunque estos estudios tienen el problema de la ausencia de un protocolo estándar para su aislamiento ^{284,324}. Por tanto, este podría ser el origen de las cepas aisladas en humanos ³²⁴. Los datos conocidos están destinados a analizar el número de aislamientos pero no poseen datos de evaluación clínica ²⁰⁴ salvo en caso de infección clara o de brotes ^{145,343}. Como pueden llegar a confundirse con otras especies, su incidencia real puede ser más alta que la registrada en los laboratorios de micobacteriología ^{98,333}.

La presencia de MNPCR en soluciones desinfectantes ^{250,345}, que pueden convertirse en focos de infección, ha sido demostrada en el seno de brotes epidémicos ^{1,36,43,129,187,345}. En estos casos y por técnicas moleculares se pueden demostrar la clonalidad de los aislamientos ^{43,149,188}, al igual que muchas infecciones asociadas a otras fuentes ambientales ³³⁸, dando lugar tanto a brotes como a pseudobrotes ^{188,365,366}. Algunos estudios recientes sobre la epidemiología de estos organismos utilizando técnicas moleculares han demostrado que, en ausencia de un foco externo, las cepas de distintos pacientes no tienen relación, por lo que la transmisión entre los seres humanos podría ser excluida como causa de enfermedad ^{100,192}.

ENFERMEDADES CAUSADAS POR MNPCR

Como patógenos humanos bien documentados que son ^{36,250,336}, las MNPCR pueden causar un amplio espectro de cuadros clínicos, incluyendo infecciones nosocomiales, especialmente en complicaciones relacionadas con la presencia de cuerpos extraños ^{36,77}, tales como infecciones de herida quirúrgica ^{209,329}, bacteriemias ^{257,342}, infecciones del tracto respiratorio ¹³⁹, infecciones osteoarticulares ^{154,165} e incluso endocarditis de válvula protésica ^{7,325,344}. En algunos casos, los cuadros clínicos producidos por estos organismos pueden llegar a ser extremadamente graves ^{36,87}. Las especies aisladas con mayor frecuencia en estas infecciones son *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* ^{36,39,100,347}, aunque en muchos otros casos estas *Bacteria* no poseen significado clínico. Otras especies de MCRNP, como *M. peregrinum* o *M. mucogenicum*, se aíslan con menor frecuencia ^{33,36,255}, y sólo en algunos casos excepcionales pueden ser consideradas como la causa de la infección ^{36,336}.

Dentro de los cuadros clínicos graves podemos incluir osteomielitis ^{104,281,285,344,347}, endocarditis ^{190,229,267,347} o infecciones respiratorias, en la mayoría de los casos sin enfermedad cavitada ^{5,139,140,166,168,206,208,347}. También pueden producir infecciones de carácter leve, como foliculitis (Figura 3) y otras infecciones de la piel, muchas veces relacionadas con tratamientos cosméticos ^{26,44,96,236,305,344,347}.

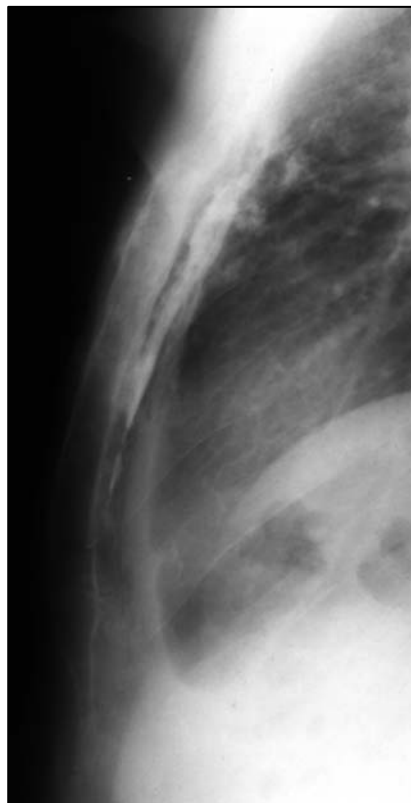
Figura 3. Foliculitis causada por MNPCR.



Otra patología relativamente frecuente es la infección respiratoria en pacientes con fibrosis quística ^{36,56,61,91,230-232}. Dentro del hospital, estos organismos son susceptibles de causar un amplio abanico de cuadros infecciosos (algunas veces de forma epidémica), entre los que pueden encontrarse infecciones del sitio quirúrgico, infecciones protésicas, bacteriemias relacionadas con catéteres e infecciones endovasculares, entre otras ^{36,250,343}. En una gran parte de los casos, estas infecciones se asocian a la presencia de cuerpos extraños, como es el caso de suturas, catéteres, prótesis ortopédicas, etc. ^{37,257,307}. La enfermedad respiratoria suele aparecer como un cuadro de infección crónica con radiología de afectación multilobar, siendo rara la enfermedad cavitada debida a estos organismos ¹³⁹. El cuadro suele aparecer en pacientes con factores de riesgo tales como bronquiectasias, acalasia, cáncer, antecedentes de tuberculosis pulmonar tratada, etc. ^{140,166,168,347}. En el caso de las endocarditis y las osteomielitis (Figura 4), los casos descritos se han

asociado frecuentemente con pacientes poseedores de algún tipo de cuerpo extraño, tales como válvulas cardiacas protésicas ^{137,184,229,267,325,345,347}, si bien hay descritos casos de endocarditis sobre válvula nativa ^{295,299}. En el caso de las osteomielitis, la infección se ha asociado a pacientes con traumatismos, tanto heridas quirúrgicas como lesiones traumáticas ^{134,147,211,214,281,285,344,352}. En otros casos la infección ósea se ha descrito en enfermos hematológicos sometidos a trasplante medular sin el antecedente de la existencia de traumatismos ^{276,313}.

Figura 4. Tomografía de osteomielitis esternal causada por *M. chelonae*.



Dentro de las infecciones relacionadas con catéteres causadas por las

MNPCR ^{257,307}, si los catéteres son vasculares, pueden dar lugar a bacteriemia o a infección del túnel del catéter ^{31,65,128,136,160,199,210,215,347,348}.

La infección diseminada ^{17,50,69,84,122,123,164,182,183,249,317} causada por estos organismos se caracteriza por la presencia de lesiones nodulares múltiples no contiguas (Figura 5), generalmente en las extremidades, sin ninguna otra sintomatología, si bien puede aparecer fiebre y detectarse bacteriemia, aunque rara vez se afectan otros órganos ^{68,69,71,136,164,176,279,291,347}.

En pacientes con inmunodepresión secundaria a tratamiento corticoideo o sin ningún defecto inmune evidente el pronóstico suele ser bueno con tratamiento, mientras que en pacientes con inmunodepresión celular severa o neoplasias vasculares la mortalidad puede ser muy elevada ¹⁶⁴. Estos cuadros suelen deberse a *M. chelonae* o a *M. abscessus*, y sólo raramente a *M. fortuitum* ³⁶.

Figura 5. Infección diseminada producida por *M. chelonae*.



Además pueden causar cuadros de meningitis, en ocasiones relacionada con catéteres ^{63,119,184,199,213,296,347}, hepatitis ³⁴⁷, artritis o tenosinovitis ^{47,177,220,319}, queratitis ^{14,35,72,73,79,121,130,161-163,197,268,282,323,326,347}, endoftalmitis ^{92,219,258,275,302,323}, linfadenitis ^{46,64,85,117,159,173,264,347,360}, otitis media y mastoiditis ^{16,113,118,195,253,316,327}, infección urinaria ^{25,95,156,234}, infección de los cables de marcapasos ⁶², mediastinitis ³⁰⁹, peritonitis postquirúrgica ¹⁷⁴, endometritis ³³⁴, e infección pleural, asociada en algún caso a infección pulmonar ^{19,283}. Muchos de estos casos son infecciones en las que existe el antecedente de intervenciones quirúrgicas u otro tipo de antecedentes médicos, por lo que se podría considerar que se trata de infecciones nosocomiales.

Algunos estudios recientes sobre infecciones causadas por las MNPCR en la piel y partes blandas, han demostrado que es necesaria la presencia de un trauma ¹² o una cirugía anterior como factor de riesgo en más del 50 % de los casos ^{12,116}.

Dada la amplitud del espectro de enfermedades que estas *Bacteria* pueden causar potencialmente, el diagnóstico puede retrasarse durante largos períodos de tiempo. Además, como estos organismos pueden crecer en los medios de cultivo empleados comúnmente en microbiología clínica, se podrían identificar erróneamente como “diferomorfos” en caso de no realizarse una tinción ácido-alcohol resistente de los mismos, riesgo que aumenta con el uso de métodos comerciales de identificación ⁹⁸.

M. fortuitum se ha aislado en infecciones respiratorias y cutáneas de origen extrahospitalario ^{36,347}, además de ser el causante de gran cantidad de

infecciones nosocomiales, incluyendo brotes en infecciones secundarias posteriores a cirugías cardíacas o plásticas, abscesos post-inyección o varios pseudobrotes ³⁴⁷. También, se ha podido aislar en infecciones de herida quirúrgica como cirugías de hernia ³⁶ y en infecciones de catéteres. Los cuadros de infección de partes blandas y tejido celular subcutáneo secundarios a inyecciones o traumatismos suelen aparecer semanas o meses después de la lesión, en algunos casos de forma epidémica, teniendo posteriormente una evolución tórpida ^{49,97,126,331,347,353}. Las infecciones de herida quirúrgica relacionadas con cirugía cardíaca ^{338,347}, cirugía plástica ^{54,55,347} u otros procedimientos quirúrgicos ^{70,151,280,347} aparecen tras un periodo de incubación de dos a ocho semanas, pudiendo aparecer incluso fiebre si la superficie afectada es de gran tamaño.

M. chelonae, anteriormente clasificada como *M. abscessus*, es una especie relativamente frecuente en algunos países europeos ¹⁰⁰. Es causante de infecciones quirúrgicas, de piel y tejidos blandos ^{83,344}. También puede causar brotes de infecciones oculares secundarias posteriores a una cirugía ³⁶.

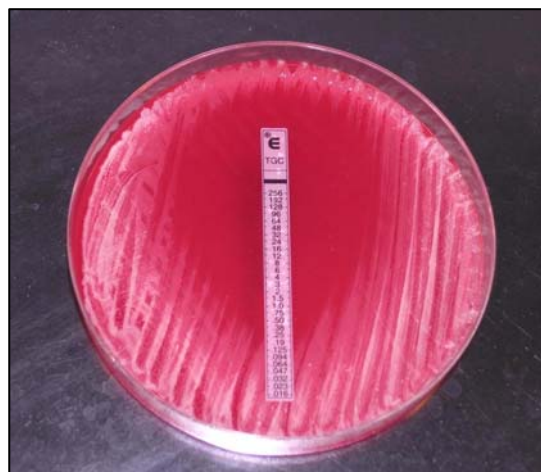
M. abscessus es más frecuente en Estados Unidos ³⁶. Causa infecciones de vías respiratorias en un amplio espectro de pacientes, incluyendo pacientes con fibrosis quística ^{36,61}. Puede causar diversas infecciones ³⁶, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos e infecciones post-quirúrgicas.

TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

Las MNPCR son resistentes a los fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de la tuberculosis, por lo que para el manejo de los pacientes

con infección por MNPCR se requiere el empleo de otros antibióticos, usados con frecuencia para tratar infecciones causadas por otros microorganismos ^{346,347}. Cada cepa de cada especie del grupo de las MNPCR puede tener, potencialmente, una sensibilidad diferente. El correcto tratamiento de las enfermedades causadas por estos organismos debe ser, por ello, individualizado y basado en las pruebas de sensibilidad pertinentes. La técnica de referencia para el estudio de sensibilidad es la microdilución en caldo. Sin embargo, esta técnica es difícil de realizar en la mayoría de laboratorios asistenciales, por lo que se emplean otras técnicas. El uso del E-test no permite conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) exacta para la mayoría de los antibióticos ²⁹, como ocurre en el caso de la tigeciclina ²⁰⁵ (Figura 6), aunque permite saber en la mayoría de los casos si la cepa a estudio es sensible o resistente, aunque se han descrito problemas de reproducibilidad ^{357,358}. Otras técnicas como el estudio mediante disco-placa no son recomendables para estos organismos ¹⁰¹.

Figura 6. Antibiograma por E-test de la tigeciclina en MNPCR.



En el tratamiento se emplean preferentemente de elección suele ser con los macrólidos, las quinolonas y la amicacina, aunque también se pueden utilizar las tetraciclinas, el cotrimoxazol o la cefoxitina ^{36,77,311,339}. El linezolid, la telitromicina o la tigeciclina parecen tener una buena actividad *in vitro* frente a estos microorganismos ^{114,340,341}. Los macrólidos claritromicina y azitromicina muestran una excelente actividad frente a *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum* y *M. peregrinum*, pero menor frente a *M. fortuitum* ^{114,115,260,261,346}. La claritromicina ha sido utilizada frecuentemente para tratar infecciones por MNPCR ^{243,348}, muchas veces en poliantibioterapia ²¹⁷, aunque se pueden llegar a producir resistencias *in vivo* en tratamientos monoterapéuticos en infecciones diseminadas por *M. chelonae*. Cuando se utilizan en combinación, suelen asociarse a la amicacina. Este antibiótico tiene una actividad bastante uniforme frente a MNPCR ^{115,152,217,308}, y sólo excepcionalmente aparecen cepas resistentes ^{36,77,114,115}.

Cuando hay un cuerpo extraño involucrado en la infección, se debe eliminar en muchos casos, para que se consiga la curación de la enfermedad.

Dentro de las MNPCR, *M. chelonae* y *M. abscessus* son más resistentes a los antibióticos que las otras especies del grupo, aunque la mayoría de las cepas de *M. chelonae* siguen siendo susceptibles a los macrólidos, especialmente a la claritromicina. La multirresistencia de las cepas de MNPCR puede hacer extremadamente difícil el tratamiento ²⁰³.

MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

La resistencia antibiótica de las MNPCR puede tener diversos orígenes, al igual

que ocurre con el resto de las *Bacteria*. Hay una serie de mecanismos muy variados entre los que se encuentran la alteración de la diana de unión, la degradación del antibiótico y la expulsión del mismo ^{120,194,277,320}. En ocasiones especiales, la molécula antibiótica puede incluso no penetrar en la célula ^{94,109}.

Una de las formas de resistencia más frecuentes a los macrólidos se debe a la modificación del sitio de unión de estos antibióticos al ribosoma, frecuentemente producida por la presencia de los genes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) ^{221,271}, que se encuentran presentes tanto en *Bacteria* Gram positivas como en Gram negativas y de los que existen una gran variedad. Estos genes codifican para metilasas (metiltransferasas) de ARNr, cuya función es añadir, de manera específica, un grupo metilo a la posición N6 del nucleótido adenina A2058 (numeración de *Escherichia coli*) de la región peptidiltransferasa de la subunidad 23S del ARNr ^{221,350}, confiriendo una resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLSB). Estas metilasas pueden monometilar o dimetilar ^{200,201}. Las monometiltransferasas Erm confieren alta resistencia a las lincosamidas y baja o moderada resistencia a los macrólidos y las estreptograminas B. Las dimetiltransferasas Erm confieren elevada resistencia a los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas B ^{200,201}. La dimetilación del nucleótido A2058 de la subunidad 23S del ARNr es el mecanismo bacteriano más común de resistencia MLSB ²⁰¹. El fenotipo puede aparecer de manera constitutiva, cuando el gen se expresa independientemente de la presencia del antibiótico, o inducible, cuando se produce con la presencia del macrólido. Varios estudios

han detectado estos genes en MNPCR ^{201,222-224}, dándose diferentes tipos de esta extensa familia genética, aunque todas las metilasas detectadas fueron de tipo inducible ²²². Son constitutivos ²²³ los genes *erm(39)* en *M. fortuitum* y *erm(38)* en *M. smegmatis* ²²³. Sin embargo, tanto el gen *erm(38)* y como el gen *erm(39)*, confieren resistencia de alto nivel a los macrólidos y las lincosamidas pero no confieren resistencia a las estreptograminas B ^{201,222-224} y se expresan ante concentraciones subinhibitorias de los macrólidos ²⁰¹.

Otro mecanismo común de resistencia es la expulsión del antibiótico por medio de proteínas transportadoras, disminuyendo la concentración intracelular del mismo ^{20,240,241,259,294,310}. Estas bombas de eflujo son proteínas de membrana activas y dependientes de energía ^{196,278}. Una de las bombas descritas en la literatura para el género *Mycobacterium* es la proteína Tap ⁴, que confiere resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos y las tetraciclinas. Está descrita en *M. fortuitum* ^{4,259}. Esta proteína presenta una significativa homología con bombas protón antitransportadoras de antibióticos, especialmente de las tetraciclinas y los macrólidos. Por tanto la bomba Tap funciona gracias a un gradiente de protones mediante un mecanismo de antiporte ⁴.

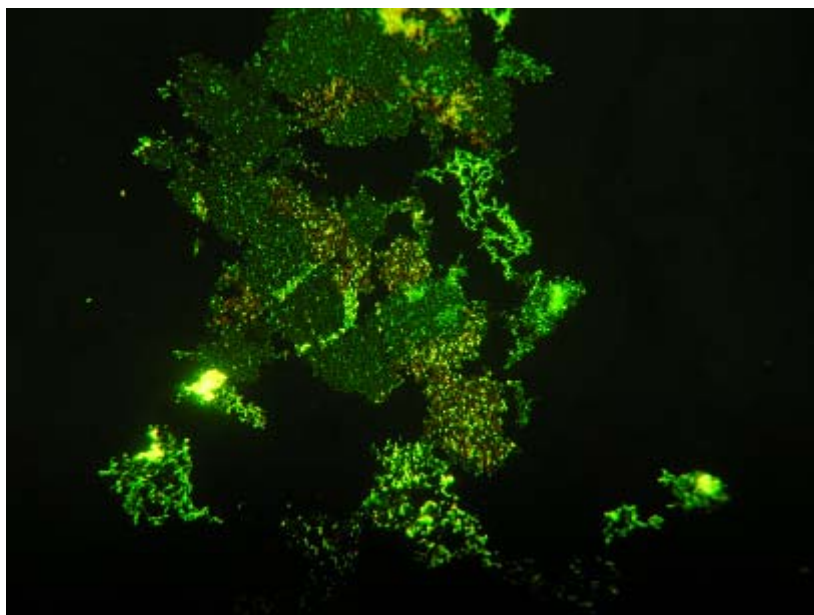
La primera bomba de eflujo descrita en el género *Mycobacterium* fue la proteína LfrA de *M. smegmatis* ^{45,310}. Esta bomba confiere baja resistencia a las fluorquinolonas hidrofílicas como el ciprofloxacino ⁴, pero no confiere resistencia a las quinolonas hidrofóbicas ¹⁹⁶. Es homóloga de la proteína QacA de *Staphylococcus aureus*, de la TcmA de *Streptomyces glaucescens* y de la Mmr de *Streptomyces coelicolor* ¹⁹⁶.

BIOPELÍCULAS

Las biopelículas son comunidades de microorganismos, en muchas ocasiones mixtas (Figura 7), que crecen embebidos en una matriz extracelular y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo o en una interfase^{58,141}. Actualmente se han definido como comunidades multicelulares compuestas de células procariotas y/o eucariotas incluidas en una matriz compuesta, al menos parcialmente, por sustancias sintetizadas por las células sésiles de la comunidad⁵⁹. La formación de estas estructuras es compleja y obedece a múltiples factores, aún no del todo conocidos²⁴⁵, y está regulada por el sistema de *quorum sensing*. Éste es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de la molécula señal o auto inductor como consecuencia del aumento en la densidad de células presentes¹⁸⁹. Todo ello da como resultado una alteración en el fenotipo de los microorganismos que forman estas estructuras como consecuencia de cambios en la expresión genética, produciéndose la transcripción de genes específicos^{58,87,88}. Estos genes permanecerían silentes en las *Bacteria* en estado planctónico, pero se activarían sólo cuando las *Bacteria* se encontrasen formando parte de la biopelícula. Parece ser que en gran cantidad de especies bacterianas, la biopelícula podría ser la forma natural de vida. Para un miembro del Dominio *Bacteria*, la formación de este tipo de estructuras posee muchas ventajas: transferencia horizontal de material genético, uso conjunto de subproductos metabólicos, mayor tolerancia a agentes antimicrobianos, etc. Aunque pueden ser asociados a procesos infecciosos, hay que señalar que tienen papel

protector (en dientes, vagina, etc.) ^{59,88,189}. Las biopelículas suponen un factor clave para la supervivencia bacteriana en diversos ambientes y permiten la colonización de nuevos nichos.

Figura 7. Biopelícula mixta obtenida de una cañería común del sistema de abastecimiento de aguas.



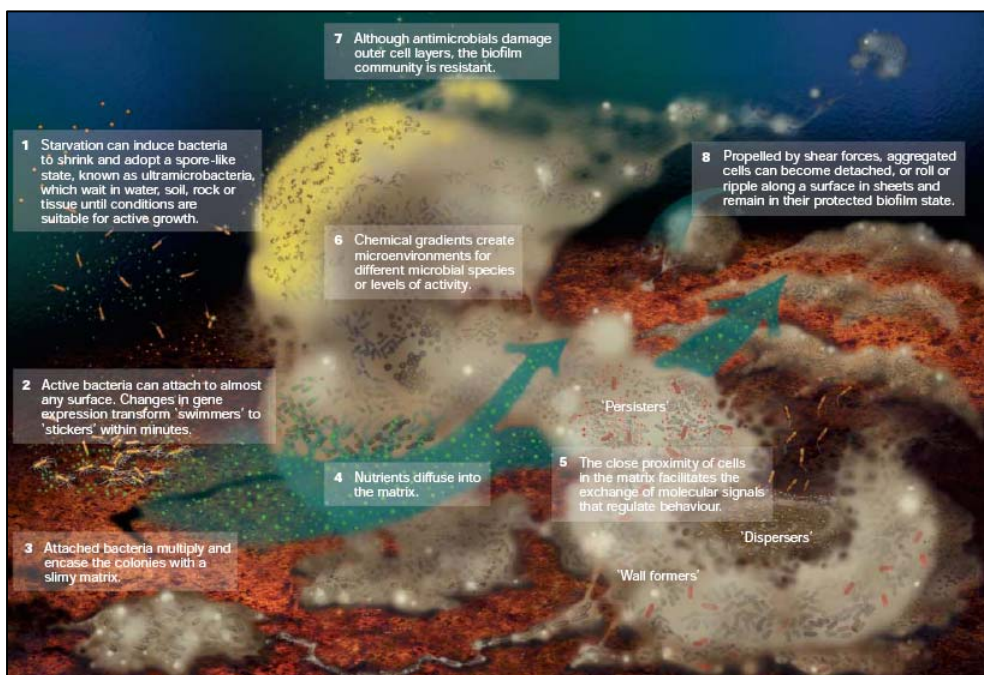
Obtenida en microscopio invertido. 40X. Tinción LIVE/DEAD[®].

Las biopelículas tienen importantes consecuencias a muchos niveles, especialmente en medicina, al estar en relación con diversas infecciones, sobre todo las relacionadas con la presencia de cuerpos extraños ¹⁴¹ o con infecciones del oído medio u otras localizaciones ^{87,125,131}. La formación de biopelículas, tanto a nivel ambiental como infeccioso, por parte de las especies del género *Mycobacterium* es un dato recogido en la literatura científica ²²⁷.

La formación de la biopelícula requiere de unos pasos muy concretos a seguir

(Esquema 1). En primer lugar, se debe dar la fijación de las *Bacteria* a la superficie. La unión inicial se debe a fuerzas débiles, como hidrofobicidad o fuerzas de Van der Waals; para, posteriormente, pasar a uniones más fuertes mediante enlaces covalentes entre estructuras presentes en el organismo y receptores del sustrato. A continuación, algunas de las *Bacteria* fijadas secretan exopolímeros que las recubren a modo de matriz extracelular. Finalmente, los microorganismos comienzan a multiplicarse ^{58,59,88,141}.

Esquema 1. Representación del desarrollo de una biopelícula.



Esquema conceptual realizado por Peg Dirckx.

El paso de la adhesión a la superficie no es bien conocido en las MNPCR, habiendo algunos estudios sobre adherencia a células o a superficies como suturas, catéteres u otros biomateriales ^{28,111,244,364}. Hay un estudio que

demuestra la colonización de la superficie interna de tuberías de cloruro de polivinilo (PVC) por *M. abscessus* y *M. chelonae*³²⁸, que además fueron capaces de sobrevivir a varios desinfectantes. Por tanto, el aislamiento de MNPCR en sistemas de abastecimiento de agua es un hallazgo importante ya que, el agua del grifo es un medio con escasa cantidad de nutrientes que, además, suele estar clorada. Un estudio realizado por Falkinham *et al.*¹¹² puso de manifiesto que la presencia de micobacterias formando biopelículas en las cañerías podría explicar que vivieran en esas condiciones. Este dato se complementa con un estudio anterior que demuestra la presencia de *M. chelonae* y *M. fortuitum* en biopelículas de los sistemas de aguas²⁹⁰. Dada la importancia de las biopelículas en la infección, estos datos podrían ser importantes en las infecciones causadas por MNPCR. Otros estudios han demostrado la presencia de micobacterias, incluyendo MNPCR, en diversas biopelículas, tanto en muestras ambientales²⁹⁰ como en modelos experimentales en animales²⁸⁸. Así mismo, y a lo largo de los años, se han ido descubriendo nuevas características de las biopelículas de MNPCR^{21,22,142,143,328}, desde el desarrollo de la misma a lo largo del tiempo generando una curva sigmoidea^{142 106} hasta que el tiempo de duplicación de las células fue más corto que con respecto a las de vida planctónica¹⁴³.

Pero la mayor importancia de esta estructura es la resistencia que confiere a las *Bacteria* hacia el medio externo o a factores ambientales estresantes^{21,22,87,88}, incluyendo a los antimicrobianos³¹⁵ o antisépticos³²⁸, diferentes, en ocasiones, a los que poseen las *Bacteria* planctónicas o de vida libre^{202,233,315}.

Los mecanismos implicados en la resistencia de las biopelículas pueden ser diversos incluyendo: la impermeabilidad a diversas sustancias (incluidos los antibióticos) debida a la matriz extracelular^{8,189,242}; la existencia de *Bacteria* en estado metabólico latente, frente a las cuales numerosos antimicrobianos son ineficaces^{202,242}, y la activación de genes de resistencia, inactivos en las *Bacteria* de vida planctónica^{303,304}, como es el caso de las bombas de eflujo^{78,202,242}. En el ser humano además, las *Bacteria* contenidas en biopelículas tienen mayor facilidad para escapar del sistema inmunitario, lo que dificulta su eliminación. Por tanto, las características de las biopelículas pueden estar relacionadas con la patogenicidad de las MNPCR y su capacidad de resistencia antimicrobiana.

Se conocen varios mecanismos moleculares implicados en la formación de biopelículas en cepas de *M. smegmatis*^{67,202,207,227,262,263,363}. Las mutantes de esta especie para fosfoquinasas y GLPs son incapaces de desarrollar una biopelícula^{227,263}. Se ha relacionado la capacidad de las micobacterias de realizar movimientos por deslizamiento con el desarrollo de las biopelículas o el fenotipo de las colonias^{207,262,263} debido a la relación entre los glucopeptidolípidos (GLPs) con la superficie de las células y con la posibilidad de exponer al exterior de la célula colas hidrofóbicas que volverían a la célula también hidrofóbica y por tanto capaz de realizar enlaces con superficies hidrofílicas, facilitando el desarrollo de la biopelícula o la misma movilidad por deslizamiento^{262,263}. Para demostrar estos hechos, también se han realizado estudios con mutantes^{227,263}.

Así mismo, se han analizado diversos genes como participantes en el desarrollo de la biopelícula, una vez más, de *M. smegmatis*^{67,227}. Uno de estos estudios analizan el gen *Isr2*⁶⁷, identificado en varias especies de micobacterias. Aunque de función no aclarada, parece que los mutantes para este gen tienen alteraciones en los lípidos apolares, con respecto a los salvajes, por lo que podría estar implicado en el metabolismo de producción de los lípidos de la pared celular^{13,179}, relacionado, así mismo, con el desarrollo de la biopelícula en micobacterias.

Otro estudio, relaciona la presencia del gen GroEL, y otros que están relacionados con él, con las biopelículas de las MNPCR. Este gen codifica para la chaperona Hsp60. En las micobacterias se pueden encontrar dos formas de la chaperona Hsp60²²⁷ relacionada con estrés por choque térmico, estrés oxidativo o respuesta frente a sistema inmunitario²²⁷: GroEL1 y GroEL2, que poseen una similitud del 60 % de la secuencia aminoacídica. Además, mientras GroEL2 posee en su extremo carboxilo terminal glicina-metionina, común en estas chaperonas, GroEL1 tiene en su extremo carboxilo terminal histidina²²⁷. Hay otras funciones descritas en la literatura para esta chaperona, que van desde participante en la señalización intercelular a regulador transcripcional²²⁷. Se han estudiado en *M. smegmatis*²²⁷ por su posible relación con las biopelículas, especialmente GroEL1. Las mutantes para este gen mostraron alteraciones en la producción de biopelículas, aunque las *Bacteria* planctónicas mostraban un fenotipo salvaje y eran capaces de adherirse a la superficie²²⁷. La chaperona GroEL1 participa en el metabolismo de la cadena corta de los

micolatos³⁶³, lo que podría indicar que éstos también participan en el desarrollo de la biopelícula. Los lípidos y no los glucopolisacáridos parecen estar implicados en el desarrollo de la matriz de la biopelícula de las MNPCR.

Uno de los factores más importantes de las biopelículas con respecto, fundamentalmente, al punto de vista clínico, es su implicación en la resistencia antimicrobiana^{202,242}. Esta implicación ha sido demostrada en *M. smegmatis*³¹⁵ y en *M. abscessus*¹³⁸. En este último caso, las células de *M. abscessus* que forman parte de la biopelícula presentaron resistencia a la amicacina y la claritromicina, sugiriendo los autores que la clave podría estar en los cambios metabólicos experimentados por las micobacterias dentro de la biopelícula¹³⁸.





OBJETIVOS



Las MNPCR son patógenos humanos conocidos. A pesar de ello, los estudios realizados para determinar las razones por las cuales estas *Bacteria* ambientales pueden ser patógenas, son escasos. Así mismo, se desconocen gran cantidad de hechos relacionados con las infecciones producidas por estos microorganismos, como son los mecanismos de resistencia antimicrobiana. Se sabe que hay una serie de factores de riesgo como pueden ser la presencia de cuerpos extraños o la realización de algún proceso quirúrgico anterior. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la hipótesis de este trabajo es: las MNPCR forman biopelículas, y esta capacidad está relacionada con la patogenia de las mismas y su resistencia antimicrobiana. Por tanto, los objetivos del presente estudio son:

I. Evaluación del significado clínico de los distintos aislamientos de MNPCR y determinación de la relación entre las cepas procedentes de distintos pacientes.

II. Estudio de sensibilidad *in vitro* de los aislamientos, tanto clínicos como de colección de las MNPCR, mediante la técnica de referencia de microdilución en caldo.

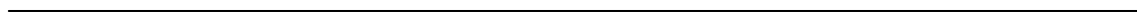
III. Caracterización, tanto en cepas clínicas como de colección, de mecanismos de resistencia a macrólidos, lincosamidas, tetracíclicas y fluorquinolonas descritos en MNPCR.

IV. Estudio de adherencia, formación de biopelículas, movilidad, fenotipo y su relación con el significado clínico de las MNPCR.

ψ. Evaluación de la penetración de los antibióticos amicacina, claritromicina y ciprofloxacino en las biopelículas desarrolladas por las MNPCR.



MATERIAL Y MÉTODOS



MICOBACTERIAS EMPLEADAS EN LOS ESTUDIOS

CEPAS DE COLECCIÓN

Se utilizaron las siguientes cepas de colección según los requerimientos de cada experimento: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium septicum* ATCC 700731^T, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium immunogenum* ATCC 700505^T, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T, *Mycobacterium porcinum* ATCC 33776^T, *Mycobacterium senegalense* NCTC 10956^T, *Mycobacterium elephantis* DSM 44368^T, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420^T y ATCC 14468, *Mycobacterium goodii* ATCC 700504^T, *Mycobacterium alvei* ATCC 51304^T, *Mycobacterium wolinskyi* ATCC 700010^T y *Mycobacterium brumae* ATCC 51384^T.

CEPAS CLÍNICAS

La experimentación se realizó con cepas aisladas de muestras clínicas procedentes de pacientes estudiados en la Fundación Jiménez Díaz. Además se añadieron los aislamientos clínicos procedentes de pacientes atendidos en diversos hospitales de Madrid y que fueron enviadas al laboratorio de Microbiología Clínica de la Fundación Jiménez Díaz en el proceso de realización de un estudio multicéntrico que contaba con la colaboración del Grupo de estudio de Micobacterias de Madrid. Los hospitales participantes en este estudio fueron: Hospital de Getafe, Hospital

Clínico San Carlos, Hospital Puerta de Hierro, Hospital de la Princesa, Hospital la Paz, Hospital Ramón y Cajal, Hospital 12 de Octubre y Hospital Gregorio Marañón ¹⁰⁵.

Las muestras clínicas se procesaron de acuerdo con los protocolos aceptados internacionalmente en cada momento para cultivo de micobacterias ^{167,212,226,270,298}. Una vez aisladas e identificadas, las cepas se mantuvieron congeladas a -20° C en leche descremada hasta que se realizaron los distintos estudios. Antes de cada estudio, se obtuvo un cultivo axénico de cada *Bacteria*.

CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS

La identificación de los aislamientos se realizó mediante la siguiente batería de pruebas bioquímicas habituales, realizada de acuerdo con los protocolos aceptados internacionalmente ³³²:

- * Reducción de nitratos (BD, EE.UU.).
- * Crecimiento en agar McConkey sin cristal violeta (BD; EE.UU.).
- * Utilización de los siguientes azúcares como fuente de carbono: citrato, manitol, sorbitol, inositol y ramnosa (Sigma, EE.UU.).
- * Producción de arilsulfatasa (tres días) (Sigma, EE.UU.).
- * Hidrólisis del Tween 80 (BD, EE.UU.).
- * Crecimiento en presencia de un 5 % de NaCl.

Así mismo, se comprobó la velocidad de crecimiento a 30° C, 37° C y 42° C, al igual que la presencia de pigmentación y la relación de ésta con la luz (fotocromogenicidad) de acuerdo con los protocolos vigentes de estudio de

estas características fenotípicas ³³².

Se realizó también a todos los aislamientos un estudio molecular mediante la técnica de la PCR-RFLP del gen *hsp65* (PRA) ^{100,314}. Para la amplificación del gen por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los cebadores TB11 Y TB12 (Grupo Taper, España) (Cuadro 2). El programa del termociclador automático (PTC-100 Peltier Thermal Cyler, MJ Research, EE.UU.) consistió en: tres minutos a 94° C; cuarenta y cinco ciclos de un minuto a 94° C, un minuto a 60° C y un minuto a 72° C; concluyendo con diez minutos a 72° C. Posteriormente se realizó el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción mediante las enzimas BstEII (60° C) y HaeIII (37° C). Los fragmentos genéticos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % (BioRad, EE.UU.). El resultado se interpretó mediante el software BIO-PROFIL versión 11.06 (Viber-Lourmat, Francia).

Cuadro 2. Secuencias de los cebadores para el PRA.

CEBADORES	
TB11	5'- ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT -3'
TB12	5'- CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT -3'

Solamente se estudió una cepa por paciente. En caso de detección de brotes o pseudobrotes, sólo se empleó una cepa de cada grupo de casos ^{100,105,107,235}.

La clonalidad de las cepas empleadas en los distintos experimentos fue determinada mediante Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ^{100,105}.

Esta técnica molecular se realizó usando el protocolo descrito por Zhang *et al*

³⁶⁵ para *M. abscessus*. Se utilizaron los cebadores OPA-2, OPA-18, IS986-FP y INS-2 (Cuadro 3), a una concentración de 100 pM, para la mezcla de reacción de PCR, con una concentración final de MgCl₂ de 2,5 mM. El protocolo de amplificación se realizó en termociclador automático con el siguiente protocolo: cuarenta ciclos a 94° C durante un minuto, 36° C durante un minuto y 72° C durante dos minutos. Los productos de amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Posteriormente se detectaron con bromuro de etidio (BioRad, EE.UU.). Como control se utilizaron cuatro aislamientos procedentes de un brote bien documentado de queratitis postquirúrgica, cuyas muestras fueron enviadas a nuestro laboratorio para su caracterización.

Cuadro 3. Secuencias de los cebadores para el RAPD.

CEBADORES	
OPA-2	5'- TGC CGA GCT G -3'
OPA-18	5'- AGG TGA CCG T -3'
IS986-FP	5'- ACG CTC AAC GCC AGA GAC CA
INS-2	5'- GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA

SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS AISLAMIENTOS

El significado clínico de las cepas se determinó considerando las características clínicas de los pacientes de acuerdo con los criterios aceptados internacionalmente, cuando las *Bacteria* fueron aisladas en muestras respiratorias ^{100,337}. En el caso de muestras procedentes de piel y tejidos blandos, la presencia de micobacterias en la muestra se consideró clínicamente relevante ¹⁰⁵ cuando:

- * La micobacteria se recuperó de la biopsia.
- * La micobacteria se recuperó en varios exudados y el cuadro clínico fue compatible con la infección por micobacterias de acuerdo con la literatura publicada.
- * En el resto de los casos se consideró clínicamente significativo ¹⁰⁵ cuando varios cultivos fueron positivos y/o el diagnóstico clínico era coherente con los síndromes descritos para estas micobacterias, incluyendo la presencia de signos o síntomas característicos y mejoría después del tratamiento específico.

Se consideraron de dudosa significación clínica los casos compatibles con los hallazgos clínicos, en ausencia de otras posibles causas y que, sin embargo, fueron interpretados como no significativos por el clínico responsable en cada caso.

DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS AISLAMIENTOS

EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Se realizó una suspensión de cada cepa de micobacteria en tampón fosfato salino (PBS) (Sigma, EE.UU.) estéril, hasta obtener una concentración de 10^8 UFC/mL, que se diluyó posteriormente hasta 10^6 UFC/mL. Se sembraron 10 μ L de esta última dilución en placas de agar triptosa soja suplementado con 5 % de sangre de carnero (TSA) (bioMérieux, Francia). Se incubaron a 30° C durante una semana. Las placas fueron revisadas diariamente y se consideró la detección de colonias de 0,5 mm de diámetro como límite para la evaluación del crecimiento, expresado en número de días, de cada cepa.

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS COLONIAS

Con la misma metodología que en el apartado anterior, se inoculó la suspensión de micobacteria en placas de agar Middlebrook 7H10. Las placas fueron incubadas a 30° C durante una semana, tras lo cual fueron analizadas mediante una lupa binocular para determinar el fenotipo liso o rugoso de las colonias.

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Este estudio, una vez más, se desarrolló tanto en cepas clínicas como de colección.

ANTIBIÓTICOS

Se estudiaron los siguientes antibióticos: tigeciclina (Wyeth, Madison, EE.UU.), levofloxacino (GSK, Reino Unido), cefoxitina, ciprofloxacino, amicacina, tobramicina, doxiciclina, cotrimoxazol, eritromicina (Sigma, EE.UU.), azitromicina (Pfizer, EE.UU.) y claritromicina (Abbott, EE.UU.).

ESTUDIO DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI)

Las CMIs se determinaron mediante la técnica de referencia de microdilución en caldo en microplacas estériles de noventa y seis pocillos ^{225,308,358}. Inicialmente, las micobacterias se incubaron en TSA durante cuatro días a 35° C en atmósfera normal, con suplemento de CO₂. Posteriormente se preparó el inóculo bacteriano directamente de las placas en caldo Müller-Hinton suplementado con cationes (Difco, EE.UU.) con 0,02 % de Tween 80 a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland. Así mismo se prepararon diluciones dobles de los antibióticos en caldo Müller-Hinton con cationes pero sin Tween 80 que se añadieron a los pocillos en un rango desde 64 a 0,03 µg/mL. El volumen final en cada pocillo fue de 0.1 ml. Cada placa se inoculó con 10 µl/pocillo, quedando una concentración final de 10⁴ UFC/pocillo. Posteriormente se incubaron las placas a 30° C durante tres días. Transcurrido ese tiempo, se realizó la lectura de la CMI.

Como controles del experimento se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC

25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, incubándose a 37° C y leyéndose a las veinticuatro horas postinoculación. Los puntos de corte de cada antibiótico son los propuestos por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, antes NCCLS) ²²⁵ (Cuadro 4).

Cuadro 4. Puntos de corte de CMI's descritos para MNPCR.

ANTIBIÓTICO	CMI (µg/L)		
	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
CEFOXITINA	≤ 16	32-64	≥ 128
CIPROFLOXACINO	≤ 1	2	≥ 4
AMICACINA	≤ 16	32	≥ 64
TOBRAMICINA	≤ 4	8	≥ 16
DOXICICLINA	≤ 1	2-8	≥ 16
COTRIMOXAZOL	≤ 32	-	≥ 64
CLARITOMICINA	≤ 2	4	≥ 8

Para interpretar la CMI tanto de la azitromicina como de la eritromicina, se utilizaron los puntos de corte de la CMI de la claritromicina. Debido a que no se han descrito los puntos de corte específicos para MNPCR de la tigeciclina y del levofloxacin, no se realizó la interpretación como sensible o resistente, pero se determinaron sus valores de CMI.

DETECCIÓN DE GENES DE LAS METILASAS *erm*

El análisis molecular se desarrolló tanto en cepas clínicas como de colección. Estas últimas se utilizaron como controles. El estudio de susceptibilidad antibiótica se realizó siguiendo los estándares descritos por el CLSI²²⁵ para los macrólidos claritromicina, azitromicina y eritromicina.

EXTRACCIÓN DE ADN

Partiendo de un cultivo fresco, se inoculó una colonia de micobacteria en 200 μ l de tampón TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM, pH 8). Después de diez minutos hirviendo a 100° C, se centrifugó quince minutos a 12.000 rpm (Microfuge 11, Beckman, EE.UU.). El sobrenadante con el ADN se recogió y se congeló a -20° C hasta su estudio.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR se realizó utilizando los cebadores de consenso (Cuadro 5) para la familia de genes *erm* descrito por Nash *et al*²²³.

Cuadro 5. Cebadores consenso.

CEBADORES	
CME-1Y	5' - ACG TGG TGG TGG GCA AYCC TG -3'
CME-2	5' - AAT TCG AAC CAC GGC CAC CAC T -3'

La mezcla de reacción se realizó para un volumen final de 25 μ L en los tubos comerciales PureTaqTM Ready-To-GoTM PCR beads (GE Healthcare, Reino Unido), con una concentración final de MgCl₂ de 1,5 mM. Se añadieron 23 μ L de mezcla de reacción y 2 μ L de ADN por tubo. Como control negativo de la

reacción, se añadió agua bidestilada estéril en vez de ADN.

El protocolo de amplificación utilizado fue:

- * Separación de las cadenas molde a 94° C durante un minuto.
- * Veinticinco ciclos de:
 - * Desnaturalización a 94° C durante treinta segundos.
 - * Hibridación de los cebadores a 60° C durante treinta segundos.
 - * Síntesis de ADN a 72° C durante treinta segundos.
- * Extensión final durante cinco minutos a 72° C.

ELECTROFORESIS

Tras obtener el ADN amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en tampón 1x TBE (10x en stock: 89mM de Tris, 89 mM de ácido bórico, 2mM de EDTA, a pH 8,4, BioRad, EE.UU.) y con bromuro de etidio. En cada muestra se añadieron 5 µl de buffer de carga (para 6x: 0,25 % de azul de bromofenol, 0,25 % de xilencianol y 40 % (p/v) de sacarosa en agua). La electroforesis se realizó en unas cubetas (Sub-Cell GT o Wide mini-sub cell GT, de BioRad, EE.UU.) durante una hora y media aproximadamente a cien voltios (suministrador de voltaje Power Pac Basic o Power Pac 300 de BioRad, EE.UU.). Se utilizó como control de peso molecular un marcador de 10 bandas (100 bp *DNA ladder*, BioRad, EE.UU.). El análisis se realizó en un transiluminador (EcoGen, EE.UU.) acoplado a un ordenador (EcoGen, National Electronics M900X, EE.UU.), con PhotoCapt software (BioGene, EE.UU.), obteniéndose fotografías de los geles. El producto de amplificación fue de

ciento setenta y cinco pares de bases.

SECUENCIACIÓN DEL AMPLICÓN

El amplicón se purificó mediante el sistema comercial *Montage PCR* (Genomics, Millipore, EE.UU.). Se prepararon 100 μ L de reacciones de amplificación, que fueron purificadas en las membranas del sistema comercial por centrifugación. Posteriormente se prepararon tubos de ADN purificado a una concentración de 100 ng por duplicado, cada uno con el cebador sentido o el cebador antisentido. El producto de la purificación se envió para su secuenciación automática al centro Secugen (Madrid, España) El resultado de la secuenciación se procesó con la herramienta *nucleotide blast* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, a quince de diciembre de 2008).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson's para calcular la relación entre la resistencia fenotípica y las presencia de genes *erm*. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS v. 15.0 para Windows (SPSS, EE.UU.).

DETECCIÓN DEL GEN *IfrA*

Como anteriormente, la detección molecular del gen se realizó tanto en cepas clínicas como de colección. Así mismo, la extracción del ADN se realizó siguiendo el método anteriormente descrito.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR se realizó utilizando los cebadores (Cuadro 6) descrito por Buroni *et al.*

45

Cuadro 6. Cebadores *IfrA*.

CEBADORES	
RG 391	5' - CGC CCC GAG CAC CGA GTT -3'
RG 392	5' - GAT GAT CGA CAG GAA GTT -3'

La mezcla de reacción se realizó para un volumen final de 25 μ L en los tubos comerciales *PureTaqTM Ready-To-GoTM PCR beads*, con una concentración final de MgCl₂ de 1,5 mM. Se añadieron 23 μ L de mezcla de reacción y 2 μ L de ADN por tubo. Como control negativo de la reacción, se añadió agua bidestilada estéril en vez de ADN.

Después se procedió a realizar la amplificación del ADN en el termociclador. El programa de amplificación estuvo compuesto por:

- * Desnaturalización a 94° C durante tres minutos.
- * Treinta ciclos de:
 - * Un minuto a 94° C.
 - * Un minuto a 61° C.

* Cuarenta y cinco segundos a 72° C.

* Quince minutos a 72° C.

ELECTROFORESIS

Posteriormente se analizó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se utilizó tampón TBE y se realizó durante una hora y media a cien voltios. El producto de amplificación se reveló con bromuro de etidio y fue de quinientas cuarenta y siete pares de bases.

SECUENCIACIÓN

En este caso la purificación se realizó mediante el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El amplicón se analizó por electroforesis en tampón TBE en gel de agarosa de bajo punto de fusión (BioRad, EE.UU.). La banda correspondiente al gen amplificado se cortó con una cuchilla limpia. Posteriormente, los trozos recortados se metieron en tubos prepesados. Se volvieron a pesar y se les añadió tres volúmenes de tampón QG por volumen de gel. Después se incubaron a 65° C durante unos diez minutos con agitación ocasional. Trascurrido ese tiempo, la solución se centrifugó a 12.000 rpm durante un minuto en la microcentrífuga (Mikro200R, Hettich, Alemania) en las columnas de purificación del sistema comercial. Las columnas se lavaron con tampón PE y se volvieron a centrifugar como anteriormente. Finalmente se transfirieron las columnas a tubos colectores limpios, eludiéndose el ADN purificado con tampón TE, mediante centrifugación. El ADN purificado se preparó para su envío al secuenciador automático como anteriormente (igual referencia).

DETECCIÓN DEL GEN *tap*

Como anteriormente, la detección molecular del gen se realizó tanto en cepas clínicas como de colección. Así mismo, la extracción del ADN se realizó de acuerdo con el método anteriormente descrito.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR se realizó utilizando los cebadores (Cuadro 7) suministrados por el Dr. Ainsa ⁴.

Cuadro 7. Cebadores *tap*.

CEBADORES	
TAP 1	5'- GTC GCG TTC CCG TGG CTG GT -3'
TAP 2	5'- CGA TAC CGG GGC CGA CGA TG -3'

La mezcla de reacción se realizó para un volumen final de 25 μ L en los tubos comerciales PureTaqTM Ready-To-GoTM PCR beads, con una concentración final de MgCl₂ de 1,5 mM. Se añadieron 23 μ L de mezcla de reacción y 2 μ L de ADN por tubo. Como control negativo de la reacción, se añadió agua bidestilada estéril en vez de ADN. Después se procedió a realizar la amplificación del ADN en el termociclador. Las fases programadas para la amplificación fueron las siguientes:

- * Desnaturalización a 94° C durante diez minutos.
- * Treinta ciclos de:
 - * Un minuto a 94° C.
 - * Tres minutos a 72° C.

ELECTROFORESIS

Posteriormente se analizó la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se utilizó tampón TBE y se realizó durante una hora y media a cien voltios. El producto de amplificación se reveló con bromuro de etidio y fue de trescientas setenta y tres pares de bases.

SECUENCIACIÓN

Este paso se realizó igual que el del gen anterior (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, a quince de diciembre de 2008).

ESTUDIO DE ADHERENCIA A BIOMATERIALES

MEDIO DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Se usó agar Middlebrook 7H10 suplementado con OADC sin antibióticos y con glicerol (BD, EE.UU.) para el cultivo de las distintas cepas de micobacterias. Las placas se incubaron a 30° C durante siete días en atmósfera normal. A continuación se aisló una colonia de cada cepa y se inoculó en caldo Middlebrook 7H9 (BD, EE.UU.) suplementado con Tween-80 0,01 % durante cinco días a 30° C, también en atmósfera normal.

EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA

Para evaluar la capacidad de adherencia de las MNPCR se siguió el protocolo descrito por Yorganci *et al*³⁶² con modificaciones.

En el experimento se utilizaron fragmentos de suturas estériles monofilamento de polipropileno (calibre 0) de 2 cm de longitud (Ethicon Inc., EE.UU.). Cada fragmento se introdujo, asépticamente, en tubos con 2,5 mL de PBS y se incubó a 37° C durante veinticuatro horas previas a la inoculación bacteriana.

Para realizar el inóculo bacteriano se centrifugaron los botes de cinco días de crecimiento de Middlebrook 7H9 durante treinta minutos a 1500 g, se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con PBS estéril. Estos pasos se repitieron una segunda vez. Finalmente, se resuspendió el sedimento en 2,5 mL de PBS estéril. Con esta suspensión se realizó una dilución bacteriana ajustada a un 0,5 de turbidez en la escala de McFarland (10^8 UFC/mL)

A continuación, el PBS de los tubos que contenían las suturas, fue sustituido por 2,5 mL del caldo Middlebrook 7H9 inoculado con las *Bacteria* a estudiar. En

aquellas cepas en las que se generaba una suspensión no homogénea, se utilizaron perlas de vidrio estériles además de una agitación vigorosa en el vórtex. Se cuantificó el inóculo bacteriano con mayor precisión mediante la realización de ocho diluciones seriadas 1:10 a partir de la original. De las tres últimas diluciones (10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) se sembraron 100 μ L en placas de Middlebrook 7H10, que fueron incubadas a 30° C durante cinco días. Se contabilizó el crecimiento bacteriano de dichas placas para confirmar los recuentos de colonias.

Las suturas con el inóculo bacteriano se incubaron a nuevamente a 37° C durante treinta minutos. A continuación, se retiró el inóculo y se sustituyó por PBS estéril. Los botes fueron reincubados durante veinticuatro horas a 37° C. Después de este último periodo de incubación, los fragmentos de sutura se lavaron doce veces en agua destilada estéril; a continuación se colocaron en tubos con 2,5 mL de PBS estéril y se sonicaron a baja potencia durante cinco minutos en un sonicador Bandelin Sonorex TK-52 (Schalltec GmbH, Alemania). La adherencia bacteriana se cuantificó mediante los recuentos obtenidos en cuatro diluciones seriadas 1:10 preparadas con el producto de la sonicación, sembrando 100 μ L de las tres últimas diluciones (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) en placas de agar Middlebrook 7H10. Las placas se incubaron a 30° C durante siete días para realizar los conteos de las colonias. La cuantificación de la adherencia de *S. epidermidis* ATCC 35983 se realizó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito pero en placas de TSA incubadas a 37° C durante veinticuatro horas seguidas de otras 24 horas en caldo triptosa soja (TSB)

(bioMérieux, Francia) a 37° C.

El número de *Bacteria* totales presentes en los 2,5 mL de PBS sonicado, correspondientes al número total de *Bacteria* adheridas al fragmento de sutura se calculó mediante el recuento del número de colonias presentes en las placas de cada dilución.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y fueron repetidos de dos a cuatro veces.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para confirmar si los resultados presentaban una distribución normal, se utilizó el test de Bartlett. Posteriormente se realizó una comparación múltiple de la media del total de recuentos bacterianos mediante el test de Kruskal-Wallis. Se realizaron comparaciones dos a dos entre las diferentes especies utilizando el test de Mann-Whitney. Para comparar las propiedades adherentes y la velocidad de crecimiento, el número de *Bacteria* totales fue analizado dividiendo los aislamientos en dos grupos (alto o bajo recuento bacteriano, tomando como punto de corte 5×10^5 UFC). El análisis estadístico se realizó mediante el test exacto de Fisher.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v. 10.0 (SPSS Inc, EE.UU.).

TÉCNICA DE DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE L MEDIO DE CULTIVO

El experimento se realizó utilizando microplacas de poliestireno de noventa y seis pocillos de fondo plano tratadas para cultivos celulares (Costar, EE.UU.).

El inóculo bacteriano se obtuvo inoculando las cepas de micobacterias en caldo Middlebrook 7H9, que se incubaron a 30° C durante cinco días. Posteriormente, se centrifugaron estos caldos de cultivo a 3000x g. EL sedimento se lavó una vez con PBS estéril. A continuación, se realizó una suspensión ajustada a un 0,5 de turbidez en la escala de McFarland en PBS, también estéril.

Los pocillos de las microplacas se inocularon con 100 µL de la anterior suspensión bacteriana. Las microplacas se incubaron a 37° C durante treinta minutos. Posteriormente se retiró el inóculo de los pocillos con una pipeta Pasteur de vidrio estéril (Afora, España). Los pocillos vacíos se lavaron con PBS estéril y se rellenaron con 100 µL de uno de los siguientes medios: Middlebrook 7H9, PBS-Glucosa 5 % (Sigma, EE.UU.), PBS-Glucosa 5 %-Glicerol 0,5 % o agua corriente esterilizada por filtración (Majadahonda).

Una vez realizada la inoculación, se incubaron las placas a temperatura ambiente, en un rango de 25° C a 32° C, y en agitación en un agitador orbital a 80 rpm, durante sesenta y nueve días. Se reemplazó el medio correspondiente en cada pocillo los días 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 41, 44, 47, 51, 54, 58, 61, 65 y 69. Los días 1, 4, 7, 11, 21, 28, 35, 41, 47, 54, 61 y 69, se dejó

vacío el pocillo correspondiente, consecutivo al del día inmediatamente anterior. Posteriormente, estos pocillos, se lavaron con agua destilada estéril y se tiñeron con fuchsina básica durante treinta minutos. Luego se lavaron con agua destilada estéril, se decoloraron diez segundos con etanol absoluto, se eliminó el etanol relavando con agua destilada estéril y se dejaron secar.

Todas las cepas se evaluaron varias veces para comprobar la reproducibilidad de la técnica.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se obtuvieron fotografías (Digital Camera Coolpix 8400, Nikon, Japón) a bajo aumento (10X) en un microscopio invertido (modelo Leite DM IL Leica, Alemania) de los pocillos teñidos de las microplacas (de tres a cuatro fotografías por pocillo). Estas fotografías se procesaron con el programa ImageJ Launcher software v.1.4.3.67 (National Institute of Health, EE.UU.), evaluándose la superficie cubierta por la biopelícula. Este dato, unido al tiempo de medición, se utilizó para generar las curvas de crecimiento de las biopelículas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias observadas en las curvas de crecimiento realizadas con los datos de superficie/tiempo obtenidos se compararon mediante un modelo mixto lineal. Si y_{ij} denota la j -ésima observación del aislamiento i , se asume que:

$$y_{ij} = \beta_1 t_{ij} + b_1 t_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

Donde t_{ij} es la j -ésima observación en el tiempo del i -ésimo aislamiento. El parámetro β_1 se corresponde con la pendiente media, mientras que la variable

aleatoria b_1 , de distribución normal, se corresponde con la pendiente aleatoria.

Se asume que b_1 sigue una distribución normal con media y desviación estándar σ_{b_1} .

Así mismo, se asume que el término de error ε_{ij} es independiente y sigue una distribución normal (varianza σ_2) para los diferentes tiempos y especies. Se pueden encontrar detalles adicionales del modelo en la referencia ²⁵¹. El análisis estadístico se realizó con el NLME software package ²⁵⁶. Para el modelo lineal de efectos mixtos se utilizó, especialmente el paquete de la referencia ²⁵².

ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE MNP CR Y SU CORRELACIÓN CON LA MOVILIDAD, EL FENOTIPO DE LA COLONIA Y EL SIGNIFICADO CLÍNICO

Siguiendo la técnica descrita en el apartado anterior ¹⁰⁶, se procedió al estudio de aislamientos clínicos. Las cepas se incubaron solamente en Middlebrook 7H9 y durante veinticinco días. Los pocillos correspondientes se fotografiaron los días 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21 y 25. Estos mismos días se sustituyó el medio de los pocillos restantes. Se utilizaron como controles positivos cepas de colección anteriormente procesadas.

PRESENCIA DE CONTAMINACIONES

De forma aleatoria, se seleccionaron pocillos para analizar la posible presencia de contaminaciones, inoculando el medio de cultivo en placas de TSA incubadas a temperatura ambiente durante tres días. Los experimentos se repitieron cuando se detectaron contaminaciones.

MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER

La microscopía confocal láser (CLSM) se utilizó también para evaluar la formación de la biopelícula. Para ello se seleccionaron aleatoriamente cepas de colección y aislamientos clínicos. En este caso se utilizaron placas de 6 x 4 pocillos (Nunc, Dinamarca.), en cuyo fondo se depositó de forma estéril discos estériles de poliestireno Thermanox[®] de 13 mm de diámetro (Nunc, Dinamarca). Se realizó un inóculo de un 0,5 de turbidez en la escala de McFarland en Middlebrook 7H9, del cual se tomó un mililitro que se añadió a los pocillos. Las placas se incubaron en las mismas condiciones que las

microplacas anteriores. Los días siete, catorce y veintiuno, el medio fue retirado y los discos de poliestireno, montados en portas con la superficie de la biopelícula expuesta, teñidos con 25 μ L durante quince minutos con la tinción de viabilidad LIVE/DEAD[®] BacLight[™] (Invitrogen, EE.UU.), a temperatura ambiente, en oscuridad en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron con agua destilada. La observación de los discos teñidos se hizo en un microscopio confocal láser Leica DM IRB (Leica, Alemania) a 40X.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se generaron curvas de crecimiento en función de la superficie cubierta y el tiempo como en el experimento anterior, pero los datos se analizaron mediante una regresión logística, para evaluar la relación entre el desarrollo de la biopelícula y la significación clínica de los aislamientos, para así predecir la variable “significado” mediante el uso de las variables “especie”, “biopelícula” y los datos obtenidos que generan las curvas de crecimiento. La relación entre el fenotipo de la colonia, la movilidad por deslizamiento y el desarrollo de la biopelículas se analizó mediante el Test de la Chi-Cuadrado, y el Test Exacto de Fisher.

ESTUDIO DE MOVILIDAD POR DESLIZAMIENTO

Se fabricaron placas de caldo Middlebrook 7H9 con 0,3 % de agar (BD, EE.UU.) o medio de movilidad sin suplementos. En el centro de cada una de estas placas se inoculó una única colonia de MNPCR. El medio inoculado se incubó a 37° C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante dos semanas en el caso de las cepas de colección. El diámetro del crecimiento bacteriano se midió los días cuatro, ocho, doce y dieciséis utilizando un calibre digital.

La movilidad de las cepas clínicas, en el mismo medio y en las mismas condiciones que anteriormente, se midió a los siete días de incubación.

La estadística de los datos obtenidos del experimento de la movilidad se realizó conjuntamente con los datos obtenidos de los experimentos de formación de biopelículas.

DETECCIÓN DEL GEN *groEL* EN MNPCR

El análisis molecular se desarrolló tanto en cepas clínicas como de colección. Estas últimas se utilizaron como controles. La extracción del material genético se realizó de la misma manera que se describe anteriormente para los otros genes estudiados.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En primer lugar se diseñaron los cebadores específicos para la detección del gen productor de la chaperona GroEL. Se utilizó una región de dicho gen perteneciente a *M. smegmatis*. La secuencia de los cebadores (Cuadro 8) se calculó mediante el programa Primer3 Output v. 0.4.0 (Whitehead Institute for Biomedical Research, EE.UU.). El amplicón resultante fue de ciento cincuenta y siete pares de bases.

Cuadro 8. Cebadores *groEL*.

CEBADORES	
GroEl 1	5´- TCG AGG AGT CCA ACA CCT TC -3´
GroEl 2	5´- GTC GAG ACC TTC GAG CTG AC -3´

La mezcla de reacción se realizó para un volumen final de 25 µL en los tubos comerciales PureTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare, Reino Unido), con una concentración final de MgCl₂ de 1,5 mM. Se añadieron 23 µL de mezcla de reacción y 2 µL de ADN por tubo. Como control negativo de la reacción, se añadió agua bidestilada estéril en vez de ADN.

Después se procedió a realizar la amplificación del DNA en el termociclador.

Las fases programadas para la amplificación fueron las siguientes:

- * Desnaturalización a 94° C durante cinco minutos.
- * Veinticinco ciclos de:
 - * Treinta segundos a 94° C.
 - * Un minuto a 61° C.
 - * Un minuto a 72° C.
- * Diez minutos a 72° C.

ELECTROFORESIS

Posteriormente se analizó la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Se utilizó tampón TBE 1x y se realizó durante una hora y media a cien voltios. El producto de amplificación se reveló con bromuro de etidio.

SECUENCIACIÓN

El amplicón se purificó mediante el kit Montage PCR (Genomics, Millipore, EE.UU.). Se prepararon 100 µL de reacciones de amplificación, que fueron purificadas en unas membranas por centrifugación. Posteriormente se prepararon tubos de ADN purificado a una concentración de 100 ng por duplicado, cada uno con el cebador sentido o el cebador antisentido. El producto de la purificación se envió para su secuenciación automática al centro Secugen (Madrid, España) El resultado de la secuenciación se procesó en la herramienta *nucleotide blast* del NCBI (igual que anteriormente).

EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN ANTIBIÓTICA EN LAS BIOPELÍCULAS

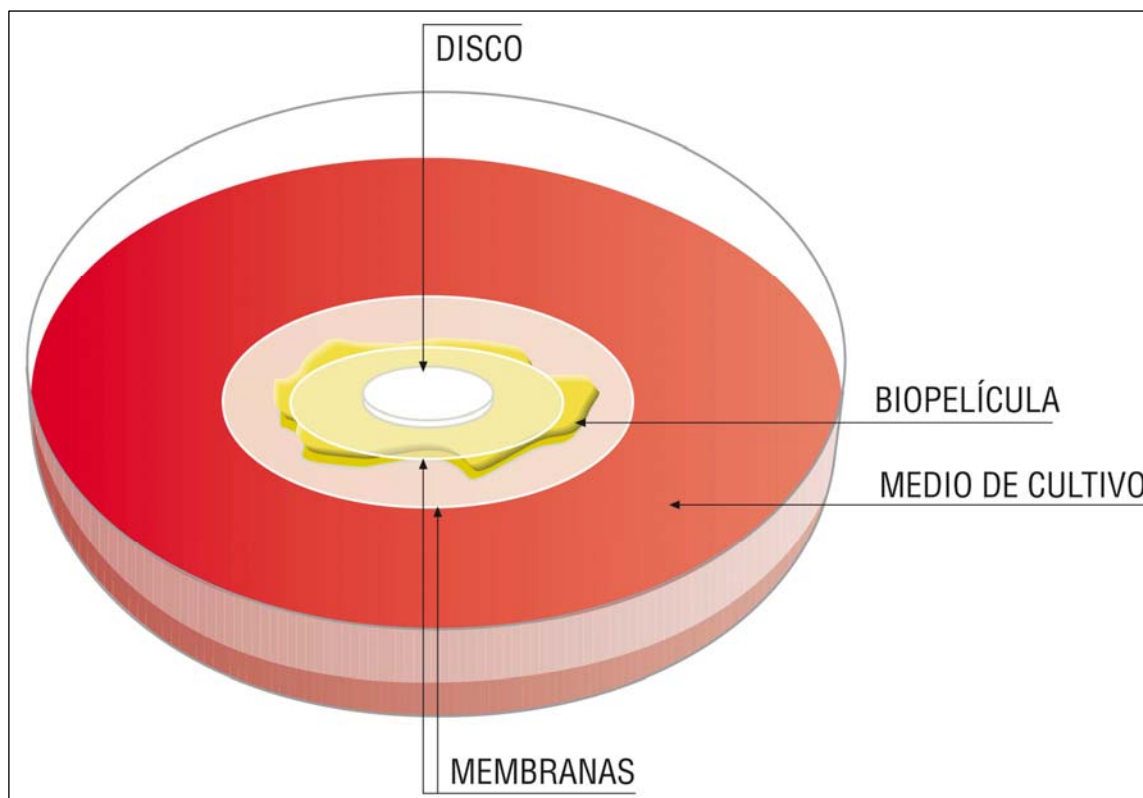
Se procedió a estudiar la potencial penetración antibiótica (permeabilidad) en las biopelículas desarrolladas de MNPCR se siguió el método descrito por Anderl *et al.*⁸ con modificaciones. En primer lugar, se realizó una suspensión bacteriana de 0,5 de turbidez en la escala de McFarland en PBS estéril, de la cual se tomaron 10 μ L que fueron inoculados en el centro de discos de policarbonato estériles, situados en placas de agar Müller-Hinton. Posteriormente, estas placas inoculadas se incubaron a 37° C durante siete días. Transcurrido este tiempo, se colocó otro disco de policarbonato sobre la biopelícula desarrollada en el anterior disco. Entonces, se colocó encima un disco de celulosa estéril impregnado del antibiótico correspondiente (15 μ g de claritromicina y ciprofloxacino, y 30 μ g de ampicilina). (Esquema 2).

A continuación se humedecieron con 15 μ l de caldo Müller-Hinton e incubaron a temperatura ambiente. Se retiraron los discos impregnados de antibiótico a las tres, seis, veinticuatro y cuarenta y ocho horas. La cantidad de antibiótico que se mantiene en el disco se detectó mediante la técnica de difusión disco-placa, utilizando la cepa *Kocuria rosea* ATCC 9341 en placas de agar Müller Hinton. Tras veinticuatro horas de incubación a 37° C, el diámetro del halo de inhibición se midió con un calibre digital.

El control positivo, o control de la permeabilidad, se realizó con idénticos discos de policarbonato, pero sin biopelícula sobre ellos. También se realizó un control negativo, o control de la impermeabilidad, utilizando discos de PARAFILM® en

vez de policarbonato en contacto con la superficie.

Esquema 2. Representación del modelo de permeabilidad de la biopelícula.



Las medidas obtenidas del control negativo se utilizaron para calcular el porcentaje de antibiótico remanente en el disco, para evitar falsos resultados debidos a la degradación de los antibióticos. Todos los experimentos, incluidos los bioensayos, se realizaron por triplicado.

Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Bartlett. Para comparar las medias se aplicaron un test de ANOVA y el test de Mann-Whitney/Wilconxon. El cálculo estadístico se realizó mediante el programa EPI-INFO 3.4.1 software (Centers for Disease Control and Prevention, EE.UU.).



RESULTADOS



SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS AISLAMIENTOS

Se aislaron e identificaron un total de ciento setenta aislamientos clínicos de MNPCR (nueve *M. abscessus*, dos *M. alvei*, treinta y tres *M. chelonae*, ochenta y nueve *M. fortuitum*, cinco *M. mageritense*, ocho *M. mucogenicum*, veintidós *M. peregrinum*, un *M. porcinum* y un *M. septicum*), procedentes tanto de la Fundación Jiménez Díaz como del Estudio Multicéntrico de Madrid. De éstas, se determinó que cuarenta y una (ocho *M. abscessus*, catorce *M. chelonae*, diecisiete *M. fortuitum* y dos *M. peregrinum*) fueron clínicamente significativas de acuerdo con los criterios anteriormente expuestos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cuadro clínico de las cepas significativas.

Cepa	Especie	Cuadro clínico
FJD-4	<i>M. chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-5	<i>M. chelonae</i>	Osteomielitis
FJD-10	<i>M. peregrinum</i>	Infección urinaria
FJD-24	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-25	<i>M. chelonae</i>	Bacteriemia relacionada con catéter
FJD-29	<i>M. chelonae</i>	Bacteriemia relacionada con catéter
FJD-43	<i>M. chelonae</i>	Endoftalmitis
FJD-51	<i>M. chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-63	<i>M. chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-64	<i>M. abscessus</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-69	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-84	<i>M. chelonae</i>	Artritis
FJD-85	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-92	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-95	<i>M. abscessus</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-172	<i>M. chelonae</i>	Bacteriemia
FJD-176	<i>M. chelonae</i>	Bacteriemia relacionada con catéter
FJD-193	<i>M. abscessus</i>	Osteomielitis

FJD-207	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-211	<i>M. chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-230	<i>M. fortuitum</i>	Infección prótesis mamaria
FJD-233	<i>M. fortuitum</i>	Infección prótesis cadera
FJD-241	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-260	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas
MCM-1	<i>M. abscessus</i>	Infección respiratoria
MCM-7	<i>M. fortuitum</i>	Infección respiratoria
MCM-8	<i>M. fortuitum</i>	Absceso cuello
MCM-13	<i>M. fortuitum</i>	Canaliculitis
MCM-14	<i>M. chelonae</i>	Bacteriemia relacionada con catéter
MCM-15	<i>M. fortuitum</i>	Infección de herida quirúrgica
MCM-16	<i>M. chelonae</i>	Endoftalmitis
MCM-24	<i>M. abscessus</i>	Fibrosis quística
MCM-25	<i>M. abscessus</i>	Fibrosis quística
MCM-28	<i>M. fortuitum</i>	Bacteriemia
MCM-32	<i>M. chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas
MCM-53	<i>M. fortuitum</i>	Bacteriemia relacionada con catéter
MCM-65	<i>M. fortuitum</i>	Bacteriemia relacionada con catéter
MCM-66	<i>M. fortuitum</i>	Bacteriemia relacionada con catéter
MCM-80	<i>M. chelonae</i>	Fibrosis quística
MCM-83	<i>M. abscessus</i>	Fibrosis quística
MCM-86	<i>M. abscessus</i>	Fibrosis quística

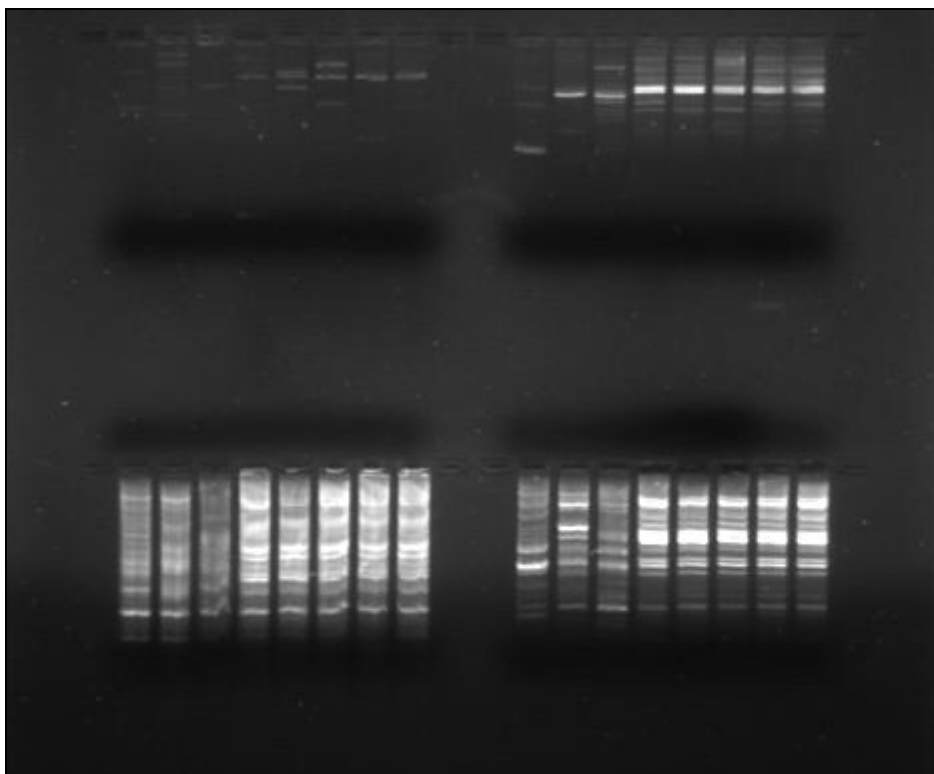
FJD: cepas procedentes de la Fundación Jiménez Díaz.

MCM: cepas procedentes del Estudio Multicéntrico de Madrid.

Es de destacar que la especie más patógena (número de aislamientos con significado clínico) fue *M. abscessus* (88,9 %), seguida de *M. chelonae* (42,4 %), *M. fortuitum* (19,1 %) y *M. peregrinum* (9,1 %). El estudio de las cepas mediante RAPD (Figura 8) demostró que todas ellas eran clones diferentes, no demostrándose ninguna relación entre los distintos aislamientos, con lo que quedó descartada la existencia de brotes epidémicos, así como de clones predominantes dentro de la población. Sí se detectó un pseudobrote de *M.*

fortuitum debido a contaminación cruzada a partir de una muestra con gran cantidad de micobacterias, probablemente a causa de la generación de aerosoles durante su procesamiento. En este caso sólo se consideró uno de los aislamientos para su inclusión en los estudios posteriores.

Figura 8. RAPD completo.



RAPD con los cebadores: OPA-2, OPA-18, IS986-FP e INS-2.

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Se estudió la sensibilidad de diecinueve cepas de colección: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium septicum* ATCC 700731^T, *Mycobacterium immunogenum* ATCC 700505^T, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T, *Mycobacterium porcinum* ATCC 33776^T, *Mycobacterium senegalense* NCTC 10956^T, *Mycobacterium elephantis* DSM 44368^T, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420^T y ATCC 14468, *Mycobacterium goodii* ATCC 700504^T, *Mycobacterium alvei* ATCC 51304^T, *Mycobacterium wolinskyi* ATCC 700010^T y *Mycobacterium brumae* ATCC 51384^T.

Además, se evaluó la sensibilidad de ciento sesenta y cinco aislamientos clínicos: nueve *M. abscessus*, dos *M. alvei*, treinta *M. chelonae*, ochenta y nueve *M. fortuitum*, cinco *M. mageritense*, seis *M. mucogenicum*, veintidós *M. peregrinum*, un *M. porcinum* y un *M. septicum*. Entre estos aislamientos clínicos, cuarenta y uno se consideraron clínicamente significativos.

Tras estudiar los valores de las CMI, se determinaron los valores de CMI₅₀ (50 % de inhibición del crecimiento) y CMI₉₀ (90 % de inhibición del crecimiento). Los resultados se muestran en los cuadros (Cuadros 10 y 11). Así mismo, el 100 % de las cepas presentaron una CMI de ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ a la tigeciclina, siendo por tanto el antimicrobiano que mejor actividad mostró por peso del estudio.

Cuadro 10. CMI's de las MNPCR con n ≥ 10 aislamientos.

Antibiótico	CMI (µg/ml)											
	<i>M. abscessus</i> (n=10)			<i>M. chelonae</i> (n=32)			<i>M. peregrinum</i> (n=23)			<i>M. fortuitum</i> (n=91)		
	CMI50	CMI90	Rango	CMI50	CMI90	Rango	CMI50	CMI90	Rango	CMI50	CMI90	Rango
Tigeciclina	0.06	0.5	≤0.03-1	0.12	0.5	≤0.03-0.5	0.06	0.06	≤0.03-0.12	≤0.03	0.25	≤0.03-0.5
Eritromicina	1	16	0.06->64	0.5	32	≤0.03->64	1	16	≤0.03->64	64	>64	0.06->64
Clarithromicina	≤0.03	1	≤0.03-32	0.06	4	≤0.03-32	0.06	2	≤0.03-16	2	16	≤0.03-64
Azitromicina	0.5	2	≤0.03-16	0.5	16	≤0.03->64	0.5	64	≤0.03->64	8	>64	≤0.03->64
Ciprofloxacino	2	8	≤0.03-8	0.12	2	≤0.03-4	≤0.03	0.06	≤0.03-0.25	≤0.03	0.12	≤0.03-4
Levofloxacino	16	32	0.12-32	0.5	8	≤0.03-64	0.06	0.25	≤0.03-0.25	0.06	0.25	≤0.03-8
Amicacina	2	8	0.25-16	1	16	0.06->64	0.5	1	≤0.03-1	1	2	0.06-32
Tobramicina	8	16	1-32	4	16	1->64	4	8	0.25-16	16	32	0.12-64
Cefoxitina	16	32	>64	16	>64	0.12>64	8	16	0.5-16	32	64	0.5-64
Doxiciclina	>64	>64	4->64	8	64	≤0.03->64	8	32	≤0.03-64	4	64	≤0.03->64
Cotrimoxazol	2	>64	0.12->64	0.5	32	0.12-64	0.25	1	0.12-1	0.12	1	0.12->64

Cuadro 11. CMI de las MNPCR con n < 10 aislamientos.

Antibiótico	CMI (µg/ml)									
	<i>M. mucogenicum</i> (n = 7)	<i>M. mageritense</i> (n = 6)	<i>M. alvei</i> (n = 3)	<i>M. smegmatis</i> (n = 3)	<i>M. porcinum</i> (n = 2)	<i>M. septicum</i> (n = 2)	<i>M. wolinskyi</i> (n = 1)			
Tigeciclina	≤0,03-0,5	≤0,03-0,25	≤0,03-0,12	≤0,03-0,06	0,06	≤0,03-0,25	0,12			
Eritromicina	≤0,03-32	32->64	≤0,03->64	0,12-16	8->64	2-32	128			
Claritromicina	≤0,03-16	2-16	≤0,03-16	≤0,03-2	0,5-8	≤0,03-2	32			
Azitromicina	≤0,03->64	2-16	≤0,03->64	0,06-32	32	0,5-16	128			
Ciprofloxacino	≤0,03-4	≤0,03-0,25	≤0,03	0,12-0,25	≤0,03-0,25	0,12-0,25	0,25			
Levofloxacino	0,06-8	≤0,03-1	≤0,03-0,12	≤0,03-0,25	0,06-0,12	0,12-16	0,06			
Amicacina	0,25-16	0,5->64	≤0,5-4	≤0,03-0,12	0,25-1	1-16	1			
Tobramicina	1-8	8->64	4-32	≤0,03-0,06	1-32	0,5-4	8			
Cefoxitina	0,5-32	1-32	2-32	1-32	2-32	32->64	1			
Doxiciclina	≤0,03-64	≤0,03-16	≤0,03-32	≤0,03	8-64	32-64	0,25			
Cotrimoxazol	0,12-64	0,12-8	0,25-0,5	0,12-1	0,12	0,12-32	0,12			

Entre las quinolonas estudiadas, el ciprofloxacino mostró la mejor actividad, especialmente en *M. fortuitum* y *M. chelonae*. En el caso de los macrólidos, la claritromicina fue el antimicrobiano con mejor actividad frente a las MNPCR, especialmente en el caso de las cepas de *M. chelonae*. Los antimicrobianos doxiciclina y cotrimoxazol mostraron una actividad *in vitro* variable. La cefoxitina mostró una baja actividad.

Se observaron tres cepas (dos *M. mageritense* y un *M. chelonae*) resistentes a la amicacina y otras dos (un *M. fortuitum* y un *M. chelonae*), con resistencia intermedia al mismo antimicrobiano de acuerdo con los criterios del CLSI ²²⁵, un hallazgo muy poco común.

DETECCIÓN DE GENES DE METILASAS *erm*

Se estudiaron las siguientes especies de colección: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium septicum* ATCC 700731^T, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium immunogenum* ATCC 700505^T, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T, *Mycobacterium porcinum* ATCC 33776^T, *Mycobacterium senegalense* NCTC 10956^T, *Mycobacterium elephantis* DSM 44368^T, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420^T y ATCC 14468, *Mycobacterium goodii* ATCC 700504^T, *Mycobacterium alvei* ATCC 51304^T, *Mycobacterium wolinskyi* ATCC 700010^T y *Mycobacterium brumae* ATCC 51384^T.

Además, fueron analizados ciento sesenta y seis aislamientos clínicos de MNPCR de las siguientes especies: nueve *M. abscessus*, dos *M. alvei*, treinta *M. chelonae*, ochenta y nueve *M. fortuitum*, cinco *M. mageritense*, siete *M. mucogenicum*, veintidós *M. peregrinum*, un *M. porcinum* y un *M. septicum*. Las CMI de los aislamientos y la detección genética (siendo 0 = ausencia del gen y 1 = presencia del gen) aparecen en el siguiente cuadro (Cuadro 12):

Cuadro 12. CMI de los aislamientos clínicos y detección del gen en estudio.

Cepa	Especie	ERI	CLA	AZ	<i>erm</i>
FJD-193	<i>M. abscessus</i>	0,5	≤0,03	0,12	0
MCM-70	<i>M. abscessus</i>	2	≤0,03	0,5	0
MCM-83	<i>M. abscessus</i>	1	≤0,03	≤0,03	0
MCM-86	<i>M. abscessus</i>	2	≤0,03	2	0
MCM-25	<i>M. abscessus</i>	0,06	≤0,03	2	1

MCM-24	<i>M. abscessus</i>	0,12	≤0,03	0,5	1
FJD-95	<i>M. abscessus</i>	>64	32	16	1
MCM-1	<i>M. abscessus</i>	0,5	≤0,03	0,25	1
FJD-64	<i>M. abscessus</i>	8	0,25	1	1
MCM-40	<i>M. alvei</i>	>64	4	16	0
FJD108	<i>M. alvei</i>	32	16	>64	1
FJD172	<i>M. chelonae</i>	0,25	0,06	0,06	1
FJD-25	<i>M. chelonae</i>	≤0,03	0,06	0,06	0
FJD-43	<i>M. chelonae</i>	0,06	≤0,03	0,06	0
FJD-176	<i>M. chelonae</i>	0,06	≤0,03	0,06	0
FJD-82	<i>M. chelonae</i>	1	0,12	0,12	0
FJD-109	<i>M. chelonae</i>	32	4	1	1
MCM-32	<i>M. chelonae</i>	1	0,25	0,12	0
MCM-4	<i>M. chelonae</i>	0,25	0,06	0,25	0
MCM-61	<i>M. chelonae</i>	0,25	0,06	0,25	0
MCM-52	<i>M. chelonae</i>	0,5	0,06	0,25	0
FJD-51	<i>M. chelonae</i>	0,25	≤0,03	0,25	0
FJD-44	<i>M. chelonae</i>	0,12	0,06	0,5	0
FJD-29	<i>M. chelonae</i>	2	0,25	0,5	0
FJD-83	<i>M. chelonae</i>	0,06	≤0,03	0,5	0
MCM-16	<i>M. chelonae</i>	0,5	≤0,03	2	1
FJD-184	<i>M. chelonae</i>	4	4	16	1
MCM-59	<i>M. chelonae</i>	>64	8	16	1
FJD-63	<i>M. chelonae</i>	≤0,03	≤0,03	0,5	0
FJD-237	<i>M. chelonae</i>	1	0,06	1	0
FJD-224	<i>M. chelonae</i>	1	0,12	1	0
MCM-31	<i>M. chelonae</i>	2	0,25	1	0
FJD-211	<i>M. chelonae</i>	0,25	<0,03	4	0
MCM-80	<i>M. chelonae</i>	0,25	≤0,03	≤0,03	0
FJD-45	<i>M. chelonae</i>	>64	32	>64	1
MCM-94	<i>M. chelonae</i>	4	≤0,03	4	1
MCM-30	<i>M. chelonae</i>	4	2	32	1
MCM-93	<i>M. chelonae</i>	16	0,25	0,5	1
FJD-4	<i>M. chelonae</i>	16	2	16	1
FJD-5	<i>M. chelonae</i>	64	2	4	1
MCM-14	<i>M. chelonae</i>	≤0,03	≤0,03	≤0,03	1
MCM-27	<i>M. fortuitum</i>	0,06	≤0,03	0,5	1
MCM-33	<i>M. fortuitum</i>	0,12	0,06	1	1
MCM-90	<i>M. fortuitum</i>	0,25	≤0,03	0,5	1
MCM-35	<i>M. fortuitum</i>	0,25	≤0,03	1	1
FJD-206	<i>M. fortuitum</i>	1	0,12	0,25	1
MCM-92	<i>M. fortuitum</i>	1	0,06	4	1
FJD-207	<i>M. fortuitum</i>	1	0,25	≤0,03	1
FJD-22	<i>M. fortuitum</i>	4	0,12	0,06	0
MCM-36	<i>M. fortuitum</i>	2	1	32	1
FJD-36	<i>M. fortuitum</i>	4	2	0,06	1

FJD-191	<i>M. fortuitum</i>	8	0,5	0,06	1
MCM-50	<i>M. fortuitum</i>	8	1	8	1
FJD-236	<i>M. fortuitum</i>	1	0,06	0,5	0
MCM-42	<i>M. fortuitum</i>	16	0,06	2	1
MCM-41	<i>M. fortuitum</i>	16	0,06	4	1
MCM-43	<i>M. fortuitum</i>	16	0,5	4	1
MCM-65	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	4	1
FJD-5A	<i>M. fortuitum</i>	64	16	4	1
MCM-75	<i>M. fortuitum</i>	0,5	0,12	0,5	0
FJD-156	<i>M. fortuitum</i>	32	2	0,5	0
FJD-233	<i>M. fortuitum</i>	1	≤0,03	0,5	0
FJD-239	<i>M. fortuitum</i>	16	2	32	1
FJD-232	<i>M. fortuitum</i>	4	0,12	1	0
MCM-28	<i>M. fortuitum</i>	16	0,5	≤0,03	1
MCM-23	<i>M. fortuitum</i>	32	2	0,12	1
FJD-221	<i>M. fortuitum</i>	32	1	0,25	1
FJD-250	<i>M. fortuitum</i>	32	2	2	1
FJD-295	<i>M. fortuitum</i>	32	2	2	1
FJD-24	<i>M. fortuitum</i>	64	4	8	1
FJD-92	<i>M. fortuitum</i>	64	4	8	1
FJD-257	<i>M. fortuitum</i>	64	4	8	1
MCM-51	<i>M. fortuitum</i>	64	4	8	1
FJD-8	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	8	1
FJD-69	<i>M. fortuitum</i>	64	8	8	1
FJD-84	<i>M. fortuitum</i>	64	8	8	1
FJD-259	<i>M. fortuitum</i>	64	8	8	1
MCM-20	<i>M. fortuitum</i>	32	2	2	1
FJD-240	<i>M. fortuitum</i>	4	0,25	1	0
MCM-17	<i>M. fortuitum</i>	32	1	4	1
FJD-242	<i>M. fortuitum</i>	32	4	16	1
MCM-15	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	16	1
M53	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	16	1
MCM-55	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	16	1
FJD-58	<i>M. fortuitum</i>	>64	8	16	1
FJD-255	<i>M. fortuitum</i>	>64	8	16	1
FJD-258	<i>M. fortuitum</i>	>64	8	16	1
FJD-3	<i>M. fortuitum</i>	>64	16	16	1
FJD-256	<i>M. fortuitum</i>	32	2	8	1
MCM-29	<i>M. fortuitum</i>	32	2	8	1
MCM-57	<i>M. fortuitum</i>	8	4	32	1
MCM-39	<i>M. fortuitum</i>	4	0,5	4	0
MCM-64	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	16	0
MCM-19	<i>M. fortuitum</i>	64	4	32	1
MCM-54	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	32	1
FJD-20	<i>M. fortuitum</i>	64	8	32	1
MCM-5	<i>M. fortuitum</i>	>64	8	32	1

MCM-9	<i>M. fortuitum</i>	>64	32	32	1
MCM-68	<i>M. fortuitum</i>	32	4	64	1
FJD-175	<i>M. fortuitum</i>	>64	16	64	1
FJD-241	<i>M. fortuitum</i>	>64	16	64	1
MCM-2	<i>M. fortuitum</i>	>64	16	64	1
MCM-66	<i>M. fortuitum</i>	>64	2	32	0
MCM-11	<i>M. fortuitum</i>	>64	64	32	0
MCM-7	<i>M. fortuitum</i>	>64	32	64	1
MCM-60	<i>M. fortuitum</i>	>64	4	64	0
MCM-8	<i>M. fortuitum</i>	>64	32	64	1
MCM-89	<i>M. fortuitum</i>	64	0,5	4	1
MCM-74	<i>M. fortuitum</i>	64	1	8	1
MCM-38	<i>M. fortuitum</i>	64	8	>64	0
MCM-22	<i>M. fortuitum</i>	64	2	8	1
FJD-61	<i>M. fortuitum</i>	32	8	>64	1
FJD-260	<i>M. fortuitum</i>	>64	8	>64	1
MCM-78	<i>M. fortuitum</i>	>64	8	>64	1
MCM-82	<i>M. fortuitum</i>	>64	8	>64	1
FJD-56	<i>M. fortuitum</i>	32	16	>64	1
MCM-87	<i>M. fortuitum</i>	0,5	≤0,03	≤0,03	0
FJD-55	<i>M. fortuitum</i>	64	16	>64	1
FJD-194	<i>M. fortuitum</i>	>64	32	>64	1
MCM-13	<i>M. fortuitum</i>	>64	32	>64	1
MCM-77	<i>M. fortuitum</i>	64	2	8	1
MCM-76	<i>M. fortuitum</i>	64	2	16	1
FJD-230	<i>M. fortuitum</i>	64	2	32	1
FJD-247	<i>M. fortuitum</i>	64	2	64	1
FJD-65	<i>M. fortuitum</i>	64	2	>64	1
MCM-91	<i>M. fortuitum</i>	>64	1	8	1
MCM-72	<i>M. fortuitum</i>	>64	2	16	1
FJD-37	<i>M. fortuitum</i>	>64	2	32	1
FJD-267	<i>M. fortuitum</i>	>64	2	>64	1
MCM-79	<i>M. fortuitum</i>	>64	2	>64	1
MCM-58	<i>M. mageritense</i>	32	2	4	1
MCM-69	<i>M. mageritense</i>	32	2	8	1
MCM-21	<i>M. mageritense</i>	64	4	16	1
MCM-56	<i>M. mageritense</i>	64	8	16	1
MCM-45	<i>M. mageritense</i>	>64	2	2	1
MCM-18	<i>M. mucogenicum</i>	0,06	≤0,03	0,06	0
FJD-19	<i>M. mucogenicum</i>	0,06	≤0,03	1	0
FJD-187	<i>M. mucogenicum</i>	0,06	≤0,03	1	0
MCM-71	<i>M. mucogenicum</i>	0,5	≤0,03	1	0
FJD-218	<i>M. mucogenicum</i>	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0
FJD-155	<i>M. mucogenicum</i>	0,06	≤0,03	≤0,03	0
FJD-18	<i>M. mucogenicum</i>	32	16	>64	1
MCM-6	<i>M. peregrinum</i>	0,25	≤0,03	0,25	1

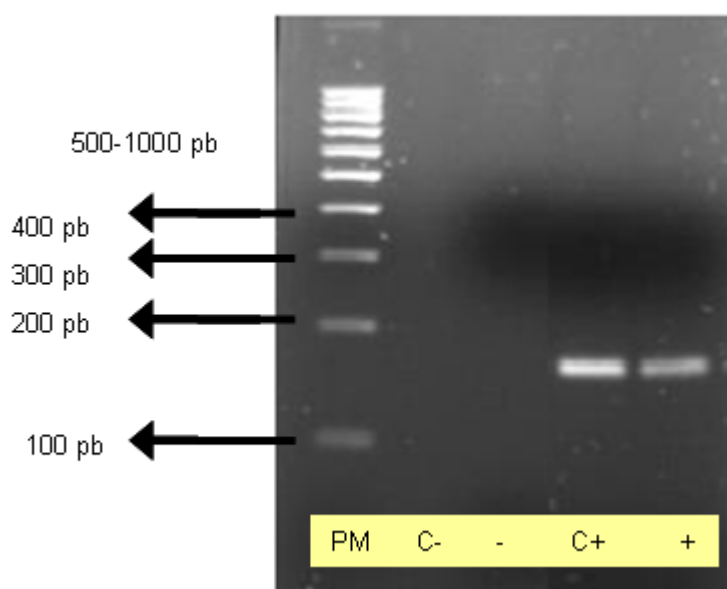
FJD-46	<i>M. peregrinum</i>	1	0,06	0,25	1
FJD-15	<i>M. peregrinum</i>	2	0,25	0,25	1
MCM-44	<i>M. peregrinum</i>	8	0,12	0,06	1
FJD-81	<i>M. peregrinum</i>	8	2	>64	1
MCM-10	<i>M. peregrinum</i>	16	0,12	0,5	1
FJD-48	<i>M. peregrinum</i>	0,12	0,06	0,25	0
FJD-26	<i>M. peregrinum</i>	0,06	0,25	0,25	0
MCM-81	<i>M. peregrinum</i>	8	≤0,03	0,25	0
FJD-272	<i>M. peregrinum</i>	2	0,12	0,5	0
MCM-12	<i>M. peregrinum</i>	32	0,12	0,5	0
FJD-53	<i>M. peregrinum</i>	0,5	0,06	1	0
FJD-213	<i>M. peregrinum</i>	1	0,06	1	0
FJD-223	<i>M. peregrinum</i>	2	0,25	1	0
FJD-274	<i>M. peregrinum</i>	2	0,25	1	0
FJD-273	<i>M. peregrinum</i>	0,12	≤0,03	1	0
FJD-271	<i>M. peregrinum</i>	0,06	0,06	2	0
FJD-85	<i>M. peregrinum</i>	0,25	0,06	≤0,03	0
MCM-3	<i>M. peregrinum</i>	>64	16	>64	1
FJD-10	<i>M. peregrinum</i>	0,06	≤0,03	≤0,03	0
MCM-49	<i>M. peregrinum</i>	1	≤0,03	≤0,03	0
MCM-46	<i>M. peregrinum</i>	≤0,03	≤0,03	≤0,03	1
FJD-40-2	<i>M. porcinum</i>	>64	8	32	1
MCM-95	<i>M. septicum</i>	2	≤0,03	0,5	1

FJD: cepas procedentes de la Fundación Jiménez Díaz.
MCM: cepas procedentes del Estudio Multicéntrico de Madrid.
ERI: eritromicina; CLA: claritromicina; AZ: azitromicina.
1: *erm* positivo; 0: *erm* negativo.

Se detectó la presencia de genes *erm* en las siguientes cepas de colección utilizadas como control: *M. fortuitum* ATCC 6841^T, *M. mageritense* ATCC 700351^T, *M. porcinum* ATCC 33776^T y *M. septicum* ATCC 700731^T. El resultado fue negativo para *M. abscessus* DSM 44196^T, *M. chelonae* ATCC 35752^T, *M. peregrinum* ATCC 14467^T, *M. mucogenicum* DSM 44124^T, y *M. alvei* ATCC 51304^T. En cuanto a los aislamientos clínicos, el 55,55 % del total de cepas de *M. abscessus* fueron positivos; el 50 % de los *M. alvei* fue positivo. De las cepas de *M. chelonae* estudiadas, un 40 % fue positivo. Entre las cepas

de *M. fortuitum*, un 84,27 % fue positivo. El 100 % de las cepas de *M. mageritense* estudiadas fue positivo. Sólo un 14,28 % de las cepas de *M. mucogenicum* fue positivo. Entre las cepas de *M. peregrinum*, un 36,36 % fue positivo. Las dos cepas estudiadas de *M. septicum* y de *M. porcinum*, fueron positivas (Figura 9).

Figura 9. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa.



PM: control de peso molecular en pares de bases.
C-: control negativo; -: negativo.
C+: control positivo; +: positivo.

Como se muestra en el cuadro, las CMI fueron más bajas para los aislamientos con genes *erm* no detectados, aunque cepas con alta CMI presentaron también, ausencia de los genes estudiado. Teniendo en cuenta los puntos de corte sugeridos por el CLSI para la claritromicina, cinco aislamientos (un *M. alvei* y cuatro *M. fortuitum*) sin resultado positivo para detección de

genes *erm*, se consideraron de fenotipo intermedio (tres cepas) o resistente (dos cepas).

Se obtuvieron sesenta cepas sensibles a la claritromicina con detección positiva para los genes *erm* (cuatro *M. abscessus*, ocho *M. chelonae*, treinta y siete *M. fortuitum*, tres *M. mageritense*, siete *M. peregrinum*, y un *M. septicum*). Sin embargo, treinta y ocho de estas cepas presentaron una CMI de la eritromicina de > 8 mg/L. En veintiuna de las cepas se obtuvo una CMI > 8 mg/L frente a la azitromicina. Teniendo en cuenta todos los macrólidos estudiados, sólo quince aislamientos tuvieron una CMI < 4 mg/L, frente a estos macrólidos, y además fueron positivos para estos genes.

La secuenciación genética de los amplicones determinó que, para *M. abscessus* se obtuvo una homología de secuencia del 90 % al 100 % con el *erm(39)*, del 83-84 % con el *erm(38)* y del 82-85 % con el *erm(40)*. Para *M. chelonae* fue del 94-99 % con el *erm(39)*, del 73-99 % con el *erm(38)* y del 84 % con el *erm(40)*. Para *M. peregrinum* fue del 95-100 % *erm(39)* y del 95 % con el *erm(38)*.

Se obtuvo una correlación entre los datos obtenidos de altas CMIs para la eritromicina y la presencia de genes *erm* (Coeficiente de Correlación de Pearson de 0,563), para la claritromicina (Coeficiente de Correlación de Pearson de 0,370) y para la azitromicina (Coeficiente de Correlación de Pearson de 0,525).

GENES DE BOMBAS DE EFLUJO ACTIVO

Se estudiaron molecularmente las siguientes especies de colección: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium septicum* ATCC 700731^T, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium immunogenum* ATCC 700505^T, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T, *Mycobacterium porcinum* ATCC 33776^T, *Mycobacterium senegalense* NCTC 10956^T, *Mycobacterium elephantis* DSM 44368^T, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420^T y ATCC 14468, *Mycobacterium goodii* ATCC 700504^T, *Mycobacterium alvei* ATCC 51304^T, *Mycobacterium wolinskyi* ATCC 700010^T y *Mycobacterium brumae* ATCC 51384^T.

Además, se analizaron ciento cincuenta y seis aislamientos clínicos de MNPCR de las siguientes especies: nueve *M. abscessus*, dos *M. alvei*, treinta y un *M. chelonae*, ochenta y dos *M. fortuitum*, cinco *M. mageritense*, cuatro *M. mucogenicum*, veintiún *M. peregrinum*, un *M. porcinum* y un *M. septicum*. Las CMI de los aislamientos y la detección genética aparecen en el siguiente cuadro (Cuadro 13):

Cuadro 13. CMIs de los aislamientos clínicos y detección genética.

Cepa	ESPECIE	<i>lfrA</i>	<i>tap</i>	DOX	TGC	CIP	LEV
FJD-64	<i>M. abscessus</i>	0	0	8	0,06	≤0,03	0,12
FJD-95	<i>M. abscessus</i>	0	1	64	≤0,03	≤0,03	0,25
FJD-193	<i>M. abscessus</i>	0	1	4	≤0,03	≤0,03	0,12
MCM-1	<i>M. abscessus</i>	0	0	64	0,06	2	16

MCM-24	<i>M. abscessus</i>	0	0	>64	0,12	4	16
MCM-25	<i>M. abscessus</i>	0	1	>64	1	8	32
MCM-70	<i>M. abscessus</i>	0	0	64	0,5	4	16
MCM-83	<i>M. abscessus</i>	0	0	32	0,06	2	32
MCM-86	<i>M. abscessus</i>	0	0	>64	0,5	8	32
FJD-108	<i>M. alvei</i>	0	1	32	0,12	≤0,03	0,12
MCM-40	<i>M. alvei</i>	0	1	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03
FJD-4	<i>M. chelonae</i>	0	1	16	≤0,03	0,25	0,06
FJD-5	<i>M. chelonae</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	0,25	0,06
FJD-25	<i>M. chelonae</i>	0	0	1	≤0,03	0,25	0,12
FJD-29	<i>M. chelonae</i>	0	0	64	0,5	2	4
FJD-43	<i>M. chelonae</i>	0	0	64	0,5	0,12	2
FJD-44	<i>M. chelonae</i>	0	1	32	0,5	0,25	2
FJD-45	<i>M. chelonae</i>	0	1	32	0,12	≤0,03	≤0,03
FJD-51	<i>M. chelonae</i>	0	0	0,06	0,25	0,12	2
FJD-63	<i>M. chelonae</i>	0	1	>64	0,25	1	1
FJD-82	<i>M. chelonae</i>	0	0	64	0,06	0,5	2
FJD-83	<i>M. chelonae</i>	0	0	16	0,12	0,25	2
FJD-109	<i>M. chelonae</i>	0	0	64	0,25	0,5	0,5
FJD-172	<i>M. chelonae</i>	1	0	0,06	0,12	0,12	0,5
FJD-176	<i>M. chelonae</i>	0	1	8	0,12	≤0,03	≤0,03
FJD-184	<i>M. chelonae</i>	0	1	0,5	0,06	0,12	0,12
FJD-211	<i>M. chelonae</i>	0	0	≤0,03	0,25	≤0,03	2
FJD-224	<i>M. chelonae</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06
FJD-237	<i>M. chelonae</i>	0	1	32	0,25	≤0,03	0,12
MCM-14	<i>M. chelonae</i>	0	1	32	≤0,03	0,5	1
MCM-16	<i>M. chelonae</i>	0	1	64	0,25	2	2
MCM-30	<i>M. chelonae</i>	0	1	≤0,03	0,25	0,06	0,06
MCM-31	<i>M. chelonae</i>	0	1	4	0,12	≤0,03	0,06
MCM-32	<i>M. chelonae</i>	0	0	32	0,5	4	8
MCM-4	<i>M. chelonae</i>	0	0	0,06	0,5	2	8
MCM-52	<i>M. chelonae</i>	1	0	64	0,5	4	32
MCM-59	<i>M. chelonae</i>	0	0	4	0,06	0,12	0,12
MCM-61	<i>M. chelonae</i>	0	0	0,25	≤0,03	0,5	0,25
MCM-80	<i>M. chelonae</i>	0	1	4	≤0,03	4	64
MCM-93	<i>M. chelonae</i>	0	1	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MCM-94	<i>M. chelonae</i>	0	0	32	0,12	0,06	0,25
FJD-40-1	<i>M. chelonae</i>	0	1	64	0,12	≤0,03	0,06
FJD-3	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,25	0,12	0,06
FJD-8	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	≤0,03	0,25	0,06
FJD-20	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,5	0,12	0,06
FJD-22	<i>M. fortuitum</i>	0	0	64	≤0,03	0,12	0,06

FJD-24	<i>M. fortuitum</i>	0	1	8	≤0,03	0,12	0,06
FJD-36	<i>M. fortuitum</i>	0	0	1	0,12	0,12	0,25
FJD-37	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	≤0,03	0,06	0,06
FJD-55	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	≤0,03	0,12	0,06
FJD-56	<i>M. fortuitum</i>	0	0	32	≤0,03	≤0,03	0,06
FJD-58	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	≤0,03	≤0,03	0,06
FJD-61	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	≤0,03	0,06	0,12
FJD-65	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,06	≤0,03	0,12
FJD-69	<i>M. fortuitum</i>	1	0	≤0,03	≤0,03	0,12	0,12
FJD-84	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	≤0,03	≤0,03	0,06
FJD-92	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06
FJD-221	<i>M. fortuitum</i>	0	1	0,06	0,25	≤0,03	≤0,03
FJD-230	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	0,06	≤0,03	0,06
FJD-232	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,25	≤0,03	0,25
FJD-233	<i>M. fortuitum</i>	0	0	≤0,03	0,12	≤0,03	0,12
FJD-236	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,25	≤0,03	0,25
FJD-239	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,25	≤0,03	0,06
FJD-240	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,25	0,25	8
FJD-241	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,12	≤0,03	0,06
FJD-242	<i>M. fortuitum</i>	0	1	16	0,12	≤0,03	0,12
FJD-247	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,06	≤0,03	0,06
FJD-250	<i>M. fortuitum</i>	0	1	0,25	≤0,03	≤0,03	0,12
FJD-255	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	0,06	≤0,03	0,12
FJD-256	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	0,06	≤0,03	0,06
FJD-257	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	0,06	≤0,03	0,12
FJD-258	<i>M. fortuitum</i>	0	1	16	0,06	≤0,03	≤0,03
FJD-259	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	0,06	≤0,03	≤0,03
FJD-260	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,06	0,06	0,12
FJD-267	<i>M. fortuitum</i>	0	0	32	≤0,03	≤0,03	0,12
FJD-295	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,12	≤0,03	0,06
FJD-5A	<i>M. fortuitum</i>	0	1	8	0,06	0,06	0,12
MCM-11	<i>M. fortuitum</i>	0	1	16	0,06	0,06	0,12
MCM-13	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	≤0,03	≤0,03	0,12
MCM-15	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,06	0,06	0,06
MCM-17	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	≤0,03	4	1
MCM-19	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,25	≤0,03	0,06
MCM-2	<i>M. fortuitum</i>	0	1	16	0,06	≤0,03	0,12
MCM-20	<i>M. fortuitum</i>	0	0	1	0,12	0,06	0,06
MCM-22	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,06	≤0,03	≤0,03
MCM-23	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	0,12	≤0,03	0,06
MCM-27	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,06	≤0,03	≤0,03
MCM-28	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,06	0,5	0,5

MCM-29	<i>M. fortuitum</i>	0	1	1	≤0,03	≤0,03	0,12
MCM-33	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	0,12	≤0,03	0,06
MCM-35	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	0,12	0,06	0,12
MCM-36	<i>M. fortuitum</i>	0	1	8	0,25	≤0,03	0,12
MCM-38	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,06	≤0,03	0,12
MCM-39	<i>M. fortuitum</i>	0	1	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MCM-41	<i>M. fortuitum</i>	0	1	1	≤0,03	≤0,03	0,12
MCM-42	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	≤0,03	0,12	0,25
MCM-43	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MCM-5	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,12	≤0,03	0,12
MCM-50	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,06	≤0,03	0,12
MCM-51	<i>M. fortuitum</i>	0	0	≤0,03	0,12	0,06	0,06
MCM-53	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	0,06	0,12
MCM-54	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,12	≤0,03	0,06
MCM-55	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,06	0,06	0,12
MCM-57	<i>M. fortuitum</i>	0	1	8	0,06	≤0,03	0,06
MCM-60	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,06	≤0,03	≤0,03
MCM-64	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	≤0,03	≤0,03	0,25
MCM-65	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	0,25	≤0,03	≤0,03
MCM-66	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,25	≤0,03	≤0,03
MCM-7	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	0,12	≤0,03	0,25
MCM-72	<i>M. fortuitum</i>	0	0	≤0,03	0,12	≤0,03	0,06
MCM-74	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,25	≤0,03	≤0,03
MCM-75	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	0,06	≤0,03	≤0,03
MCM-76	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,06	≤0,03	0,06
MCM-77	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	0,06	≤0,03	0,06
MCM-78	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MCM-79	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06
MCM-8	<i>M. fortuitum</i>	0	1	64	0,06	≤0,03	≤0,03
MCM-82	<i>M. fortuitum</i>	0	1	4	≤0,03	≤0,03	0,06
MCM-87	<i>M. fortuitum</i>	0	0	0,06	≤0,03	≤0,03	0,25
MCM-89	<i>M. fortuitum</i>	0	1	32	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MCM-9	<i>M. fortuitum</i>	0	1	16	0,06	≤0,03	0,06
MCM-90	<i>M. fortuitum</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MCM-91	<i>M. fortuitum</i>	0	1	8	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MCM-92	<i>M. fortuitum</i>	0	1	2	≤0,03	≤0,03	0,06
MCM-21	<i>M. mageritense</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,25
MCM-45	<i>M. mageritense</i>	0	0	0,5	≤0,03	0,12	0,12
MCM-56	<i>M. mageritense</i>	0	1	16	0,06	0,12	0,25
MCM-58	<i>M. mageritense</i>	0	0	2	≤0,03	0,06	0,12
MCM-69	<i>M. mageritense</i>	0	1	8	0,12	0,25	1
FJD-18	<i>M. mucogenicum</i>	0	0	0,25	0,06	0,25	0,06

FJD-19	<i>M. mucogenicum</i>	0	0	≤0,03	0,12	0,25	0,12
MCM-18	<i>M. mucogenicum</i>	0	0	≤0,03	≤0,03	0,12	0,5
MCM-71	<i>M. mucogenicum</i>	1	0	64	0,5	4	8
FJD-10	<i>M. peregrinum</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	0,25	0,06
FJD-15	<i>M. peregrinum</i>	0	1	0,5	0,06	0,06	0,06
FJD-26	<i>M. peregrinum</i>	0	1	32	≤0,03	0,25	≤0,03
FJD-46	<i>M. peregrinum</i>	0	1	8	0,06	≤0,03	0,12
FJD-48	<i>M. peregrinum</i>	0	1	8	0,06	≤0,03	≤0,03
FJD-53	<i>M. peregrinum</i>	0	1	8	≤0,03	≤0,03	≤0,03
FJD-81	<i>M. peregrinum</i>	0	0	8	≤0,03	≤0,03	≤0,03
FJD-85	<i>M. peregrinum</i>	0	1	64	≤0,03	≤0,03	0,12
FJD-213	<i>M. peregrinum</i>	0	1	≤0,03	0,06	≤0,03	≤0,03
FJD-223	<i>M. peregrinum</i>	0	1	0,25	0,12	0,06	0,25
FJD-271	<i>M. peregrinum</i>	0	1	4	0,06	≤0,03	≤0,03
FJD-272	<i>M. peregrinum</i>	0	1	8	≤0,03	≤0,03	≤0,03
FJD-273	<i>M. peregrinum</i>	0	1	32	0,06	≤0,03	≤0,03
MCM-10	<i>M. peregrinum</i>	0	1	32	0,06	≤0,03	≤0,03
MCM-12	<i>M. peregrinum</i>	0	1	32	0,06	≤0,03	0,06
MCM-3	<i>M. peregrinum</i>	0	1	32	0,06	≤0,03	0,12
MCM-44	<i>M. peregrinum</i>	0	1	4	≤0,03	≤0,03	0,25
MCM-46	<i>M. peregrinum</i>	0	1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06
MCM-49	<i>M. peregrinum</i>	0	0	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06
MCM-6	<i>M. peregrinum</i>	0	1	64	0,12	≤0,03	0,12
MCM-81	<i>M. peregrinum</i>	0	1	32	≤0,03	≤0,03	0,06
FJD-40-2	<i>M. porcinum</i>	0	1	64	0,06	≤0,03	0,12
MCM-95	<i>M. septicum</i>	0	0	64	0,25	4	16

FJD: cepas procedentes de la Fundación Jiménez Díaz.

MCM: cepas procedentes del Estudio Multicéntrico de Madrid.

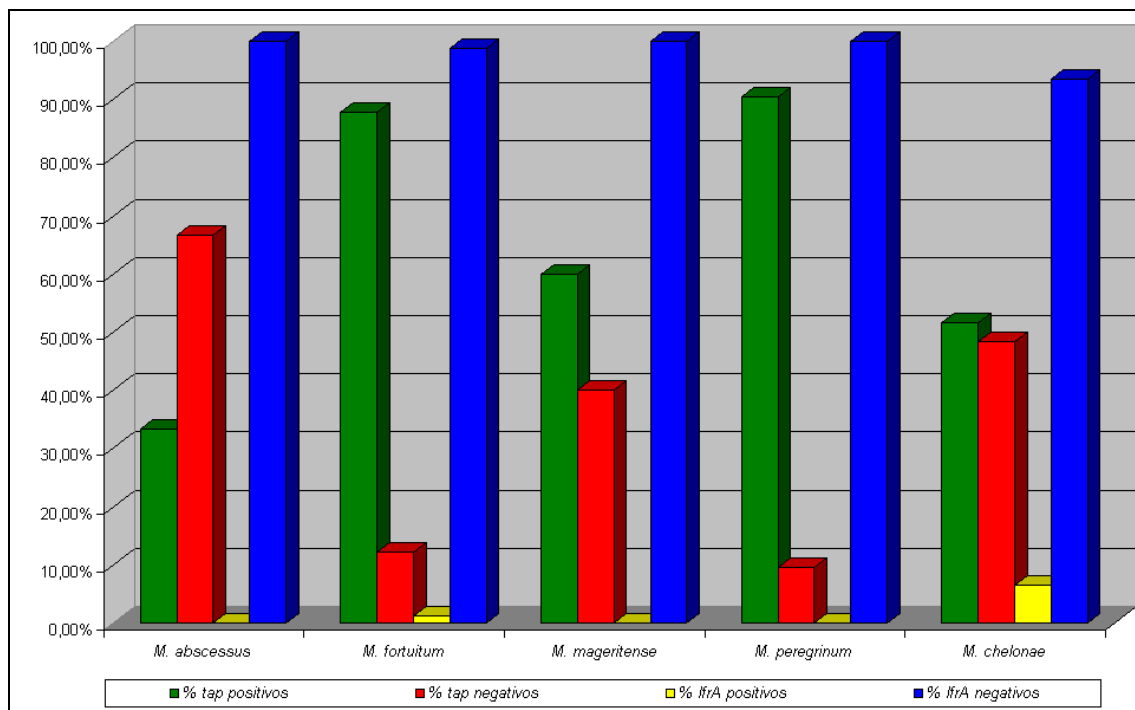
DOX: doxiciclina; TGC: tigeciclina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino.

1: *lfrA/tap* positivo; 0: *lfrA/tap* negativo.

En el estudio de detección del gen *lfrA* (Gráfico 1), las cepas de colección *M. elephantis* DSM 44368^T, *M. smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420^T y ATCC 14468 dieron resultados positivos, mientras que *M. fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *M. chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *M. abscessus* DSM 44196^T, *M. peregrinum* ATCC 14467^T, *M. septicum* ATCC 700731^T, *M. mucogenicum* DSM 44124, *M. immunogenum* ATCC 700505^T, *M. mageritense*

ATCC 700351^T, *M. porcinum* ATCC 33776^T, *M. senegalense* NCTC 10956^T, *M. goodii* ATCC 700504^T, *M. alvei* ATCC 51304^T, *M. wolinskyi* ATCC 700010^T y *M. brumae* ATCC 51384^T fueron negativas. En cuanto a las cepas clínicas, sólo un 6,45 % de las cepas de *M. chelonae*, un 1,22 % de las cepas de *M. fortuitum* y un 25 % de las cepas de *M. mucogenicum*, fueron positivas para dicho gen.

Gráfico 1. Porcentajes de los dos genes en especies con ≥ cinco aislamientos.



En cuanto al estudio de gen *tap* (Gráfico 1), se obtuvo que el 33,33 % de las cepas clínicas de *M. abscessus* fueron positivas. El 100 % de los *M. alvei* fueron positivos. El 51,62 % de las cepas de *M. chelonae* fueron positivas. En cuanto a las cepas de *M. fortuitum*, un 87,80 % fueron positivas. El 60 % de las cepas estudiadas de *M. mageritense* fueron positivas. Ninguna cepa estudiada de *M. mucogenicum* fue positiva. Un 90,48 % de las cepas de *M. peregrinum*

dio resultados positivos. Sólo *M. peregrinum* ATCC 14467^T, *M. septicum* ATCC 700731^T y *M. porcinum* ATCC 33776^T fueron positivas en la detección del gen mientras que *M. fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *M. chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *M. abscessus* DSM 44196^T, *M. mucogenicum* DSM 44124, *M. immunogenum* ATCC 700505^T, *M. mageritense* ATCC 700351^T, *M. senegalense* NCTC 10956^T, *M. elephantis* DSM 44368^T, *M. smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420^T y ATCC 14468, *M. goodii* ATCC 700504^T, *M. alvei* ATCC 51304^T, *M. wolinskyi* ATCC 700010^T y *M. brumae* ATCC 51384^T fueron negativas en esta detección.

No se encontraron, en ninguna de las especies estudiadas, cepas positivas para ambos genes (Cuadro 14).

Cuadro 14. Relación entre los dos genes en especies con \geq cinco aislamientos.

Especie	<i>lfrA+</i> / <i>tap+</i>	<i>lfrA+</i> / <i>tap-</i>	<i>lfrA-</i> / <i>tap-</i>	<i>lfrA-</i> / <i>tap+</i>
<i>M. abscessus</i>	0,00%	0,00%	66,66%	33,34%
<i>M. chelonae</i>	0,00%	6,45%	41,93%	51,62%
<i>M. fortuitum</i>	0,00%	1,22%	10,98%	87,80%
<i>M. mageritense</i>	0,00%	0,00%	40,00%	60,00%
<i>M. peregrinum</i>	0,00%	0,00%	9,52%	90,48%

lfrA+: *lfrA* positivo; *lfrA-*: *lfrA* negativo.

tap+: *tap* positivo; *tap-*: *tap* negativo.

De las ciento cincuenta y seis cepas clínicas estudiadas, sólo cuatro dieron resultados positivos en la detección del gen *lfrA*. Dos de éstas, un *M. chelonae* y un *M. fortuitum*, presentaron una CMI al ciprofloxacino de 0,12 (fenotipo sensible). Una cepa de *M. mucogenicum* y otra de *M. chelonae* presentaron una CMI de 4 (fenotipo intermedio).

En el caso del estudio del gen *tap*, de las ciento cincuenta y seis cepas clínicas estudiadas, treinta y una cepas sensibles a la doxiciclina dieron fueron positivas para el gen *tap* (cinco *M. chelonae*, diecinueve *M. fortuitum*, un *M. mageritense*, cinco *M. peregrinum* y un *M. alvei*). Así mismo se obtuvieron cuatro cepas con fenotipo intermedio y con resultado negativo en la detección genética y dieciséis resistentes con igual resultado en el estudio genético.

La secuenciación genética de los amplicones del gen *lfrA* reveló una similitud de entre un 88 % a un 92 % con el gen de *M. smegmatis*, catalogado en el NCBI.

En cuanto a la secuenciación del gen *tap*, se obtuvieron unos valores de similitud con el mismo gen de *M. fortuitum* de un 92 % a un 95 %, independientemente de la especie analizada.

ESTUDIO DE ADHERENCIA.

Las cepas de colección utilizadas fueron *Mycobacterium fortuitum* ATCC 13756, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T y *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124. Se seleccionaron, así mismo, treinta aislamientos clínicos. (Cuadro 15) de MNPCR: dos *M. abscessus*, ocho *M. chelonae*, once *M. fortuitum*, dos *M. mucogenicum*, seis *M. peregrinum* y un *M. porcinum*. De estas cepas, ocho fueron clínicamente significativas (dos *M. abscessus*, cuatro *M. chelonae* y dos *M. fortuitum*).

Del total de cepas estudiadas, veintiséis aislamientos produjeron colonias de 0,5 mm a los cuatro días; seis aislamientos, a los cinco días; y dos aislamientos a los seis días.

Cuadro 15: Características de las cepas clínicas y de colección estudiadas.

Cepa	Especie	Muestra	Significado clínico	Crecimiento
ATCC 13756	<i>M. fortuitum</i>	NA	NA	4 días
ATCC 19235	<i>M. chelonae</i>	NA	NA	4 días
FJD-24	<i>M. fortuitum</i>	Biopsia piel	Si	4 días
FJD-26	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	4 días
FJD-36	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	5 días
FJD-37	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	4 días
FJD-53	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	5 días
FJD-55	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	4 días
FJD-56	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	4 días
FJD-58	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	4 días
FJD-61	<i>M. fortuitum</i>	Lavado bronquial	No	4 días
FJD-65	<i>M. fortuitum</i>	Esputo	No	5 días
FJD-69	<i>M. fortuitum</i>	Biopsia piel	Si	4 días
FJD-25	<i>M. chelonae</i>	Hemocultivo	Si	6 días

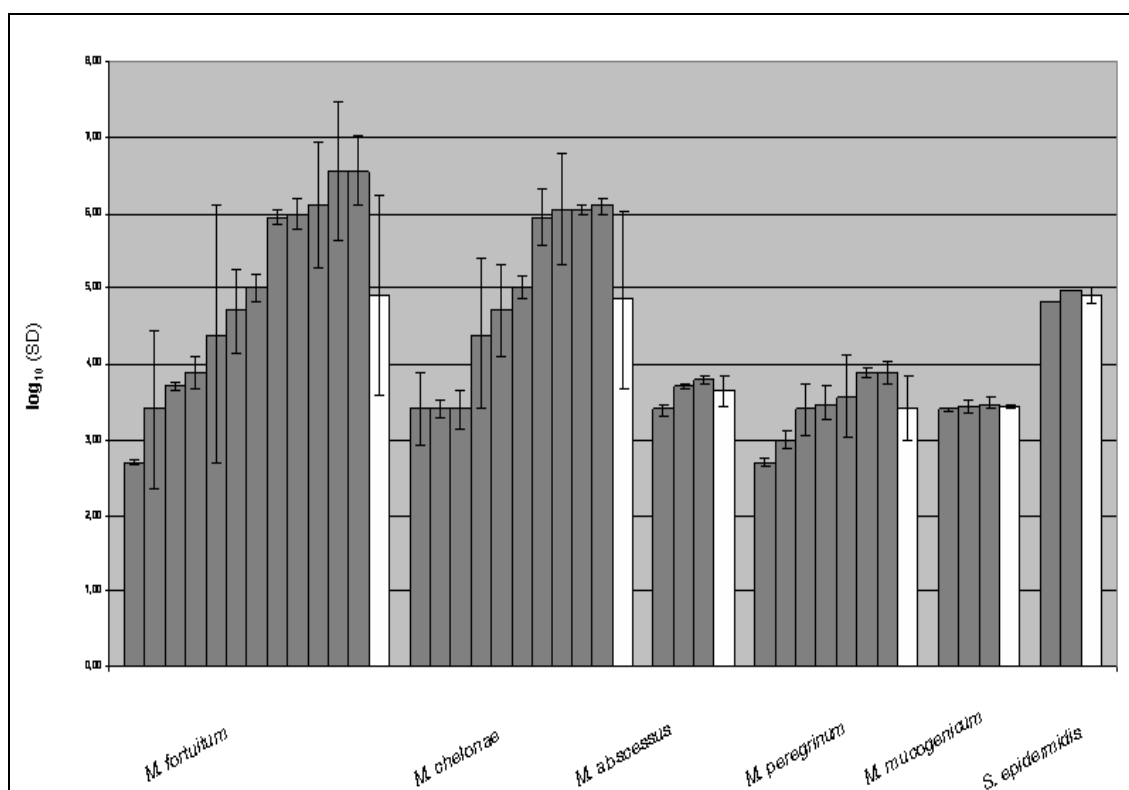
FJD-29	<i>M. chelonae</i>	Exudado herida	Si	4 días
FJD-43	<i>M. chelonae</i>	Humor vítreo	Si	5 días
FJD-44	<i>M. chelonae</i>	Líquido ascítico	No	4 días
FJD-50	<i>M. chelonae</i>	Exudado herida	Si	6 días
FJD-51	<i>M. chelonae</i>	Exudado herida	No	5 días
FJD-83	<i>M. chelonae</i>	Biopsia pleura	No	5 días
FJD-40-1	<i>M. chelonae</i>	Líquido pleural	No	4 días
FJD-40-2	<i>M. porcinum</i>	Líquido pleural	No	4 días
FJD-64	<i>M. abscessus</i>	Exudado herida	Si	4 días
FJD-95	<i>M. abscessus</i>	Exudado herida	Si	4 días
DSM 44196	<i>M. abscessus</i>	NA	NA	4 días
FJD-18	<i>M. peregrinum</i>	Líquido pericárdico	No	4 días
FJD-15	<i>M. peregrinum</i>	Hemocultivo	No	4 días
FJD-20	<i>M. peregrinum</i>	Biopsia renal	No	4 días
FJD-72	<i>M. peregrinum</i>	Aspirado bronquial	No	4 días
ATCC 14467	<i>M. peregrinum</i>	NA	NA	4 días
FJD-213	<i>M. peregrinum</i>	Biopsia pulmón	No	4 días
FJD-223	<i>M. peregrinum</i>	Orina	No	4 días
DSM 44124	<i>M. mucogenicum</i>	NA	NA	5 días
FJD-155	<i>M. mucogenicum</i>	Líquido pleural	No	4 días
FJD-187	<i>M. mucogenicum</i>	Hemocultivo	No	4 días

NA: No aplicable.

Todas las *Bacteria* estudiadas presentaron adherencia a las suturas de polipropileno. *M. fortuitum* fue la especie estudiada con más adherencia (media del número total de *Bacteria* adheridas más elevada), mientras que *M.*

mucogenicum fue la especie con la media más baja. Los valores medios, el intervalo de confianza la 95 % (IC) y el rango de *Bacteria* adheridas para las diferentes especies de MNPCR estudiadas fueron: para *M. fortuitum*, $3,5 \times 10^5$, IC: $6,6 \times 10^3 - 6,9 \times 10^5$, rango: $5 \times 10^2 - 3,6 \times 10^6$; para *M. chelonae*, $1,9 \times 10^5$, IC: $2,5 \times 10^4 - 3,5 \times 10^5$, rango: $2,5 \times 10^3 - 1,2 \times 10^6$; para *M. abscessus*, $1,8 \times 10^3$, IC: $0 - 3,7 \times 10^3$, rango: $2,5 \times 10^3 - 6,25 \times 10^3$; para *M. peregrinum*, $1,5 \times 10^3$; IC: $4,2 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$, rango: $5 \times 10^2 - 7,5 \times 10^3$; para *M. mucogenicum*, $1,1 \times 10^3$, IC: $8,5 \times 10^2 - 1,3 \times 10^3$, rango: $2,5 \times 10^3 - 3 \times 10^3$; y para *S. epidermidis*, $3,3 \times 10^4$, IC: $0 - 1,1 \times 10^5$, rango: $6,75 \times 10^4 - 9,75 \times 10^4$. El \log_{10} de los valores de las medias se muestra en el gráfico (Gráfico 2).

Gráfico 2. \log_{10} de los valores de las medias.



Número total de *Bacteria* adheridas a las suturas expresado en \log_{10} . En gris, columnas con los valores individuales de cada aislamiento. En blanco, media por cada especie. SD: desviación típica / desviación estándar.

Se observaron dos grupos claramente diferenciados tanto en *M. chelonae* como en *M. fortuitum* en función de los valores obtenidos de la adherencia. Algunas *Bacteria* mostraron altos valores de adhesión (cinco cepas de *M. fortuitum* y cuatro *M. chelonae*) con recuentos totales superiores a 350×10^3 UFC), mientras que otras cepas dieron resultados similares a los de *M. peregrinum* y *M. mucogenicum*. A destacar, una cepa de *M. fortuitum* que dio resultados muy bajos (500 UFC) en comparación con todas las demás cepas.

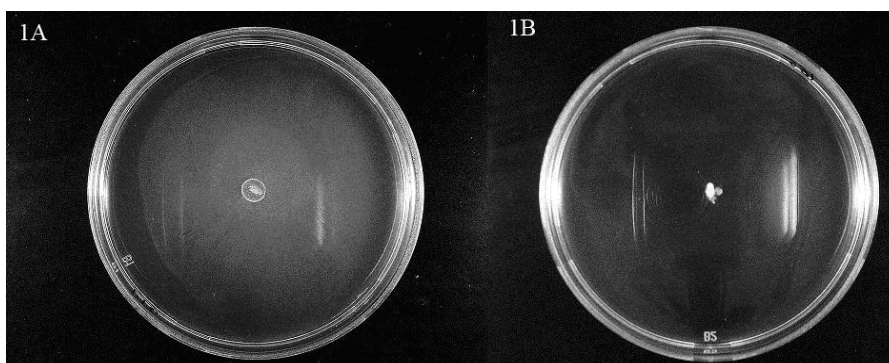
Los datos se analizaron mediante una comparación múltiple de la media total de *Bacteria* entre las especies. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0577$). Sin embargo, la comparación de especies dos a dos mediante el test de Mann-Whitney reveló diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de *M. fortuitum* frente a las cepas de *M. peregrinum* ($p = 0,017$) y *M. chelonae* vs. *M. peregrinum* ($p = 0,033$). Fue casi estadísticamente significativa la diferencia entre *S. epidermidis* y *M. peregrinum* ($p = 0,055$).

Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la tasa de crecimiento y las cepas de alta o baja adhesión. Este análisis se realizó mediante la prueba exacta de Fisher ($p = 0,2$).

TÉCNICA DE DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS E INMUNOPCR Y EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DEL MEDIO DE CULTIVO

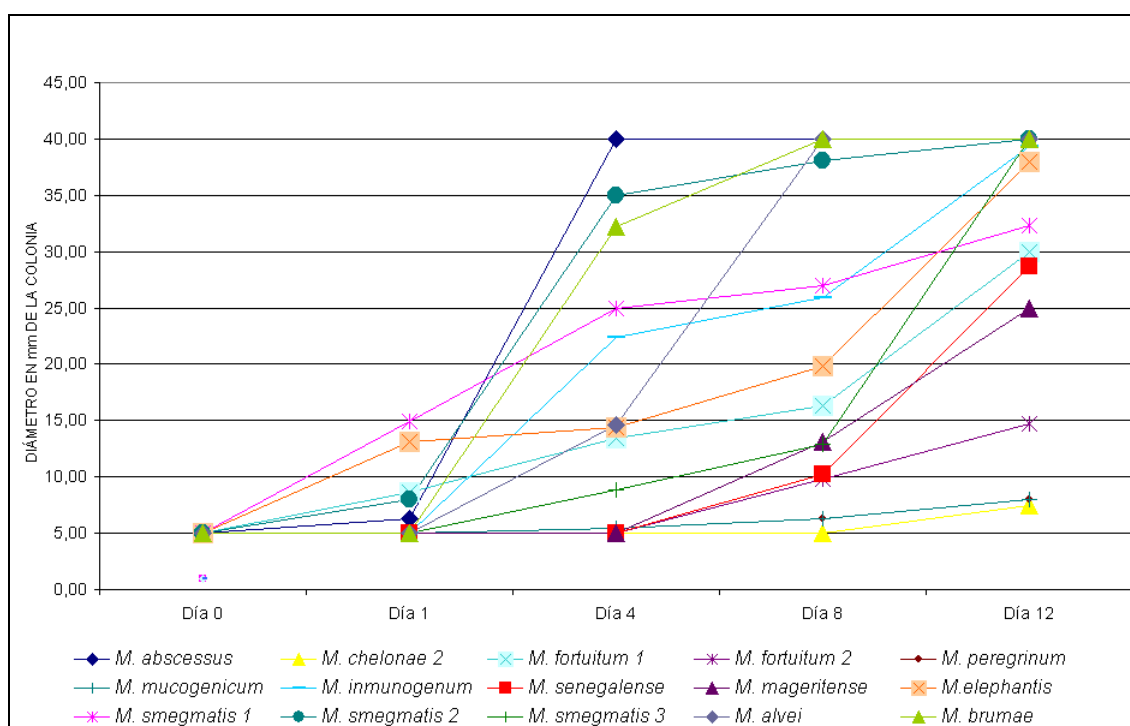
Se realizó con cepas de colección, incluyendo cepas tipo de algunas especies: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium septicum* ATCC 700731^T, *Mycobacterium immunogenum* ATCC 700505^T, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T, *Mycobacterium porcinum* ATCC 33776^T, *Mycobacterium senegalense* NCTC 10956^T, *Mycobacterium elephantis* DSM 44368^T, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 3032, ATCC 19420^T y ATCC 14468, *Mycobacterium goodii* ATCC 700504^T, *Mycobacterium alvei* ATCC 51304^T y *Mycobacterium brumae* ATCC 51384^T. Los datos obtenidos tanto de los experimentos de formación de biopelículas como los de movilidad se procesaron conjuntos por estar posiblemente relacionados. Todas las cepas de colección excepto *M. goodii*, *M. chelonae* ATCC 19235, *M. porcinum* y *M. septicum* (Figura 10), presentaron movilidad en el medio.

Figura 10. Movilidad. 1A: *M. abscessus*. 1B: *M. septicum*.



Se detectaron diferencias en la velocidad de movilidad de las *Bacteria*, siendo *M. chelonae* ATCC 35752^T la más lenta y *M. abscessus*, la más rápida (Gráfico 3).

Gráfico 3. Movilidad de las cepas de colección de MNPCR.



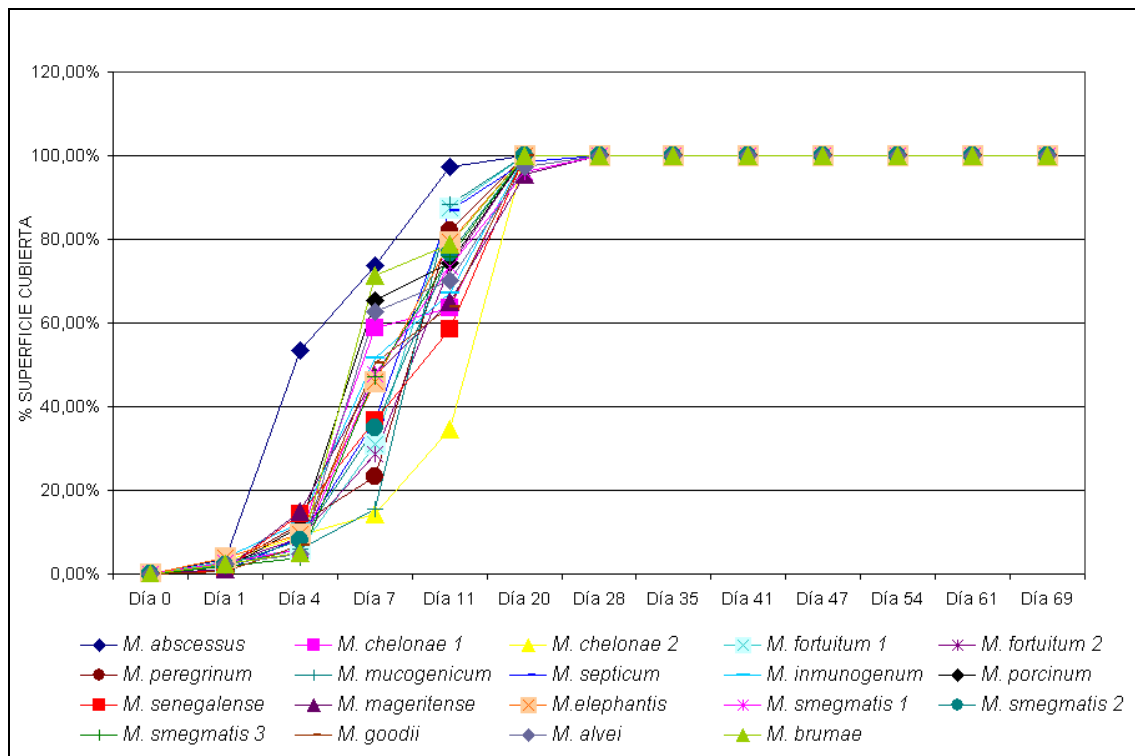
M. chelonae 1: ATCC 19235; *M. chelonae* 2: ATCC 35752^T; *M. fortuitum* 1: ATCC 6841^T; *M. fortuitum* 2: ATCC 13756; *M. smegmatis* 1: ATCC 607; *M. smegmatis* 2: ATCC 19420^T; *M. smegmatis* 3: ATCC 14468.

La reproducibilidad del test se determinó mediante las tres cepas de *M. smegmatis* repetidas, así mismo, por triplicado. En todos los casos se desarrollaron similares porcentajes de superficie cubierta por la biopelícula y con idénticas pautas. No se detectaron diferencias entre este primer experimento y la repetición de las cepas de *M. smegmatis* junto con el resto de las cepas de colección. Estos últimos son los datos utilizados para el cálculo

estadístico.

Todas las cepas fueron capaces de desarrollar biopelículas en los tres medios. En medio Middlebrook 7H9, todas las cepas cubrieron el 100% de la superficie del pocillo a los veintiocho días de incubación, presentando en su desarrollo una curva de tipo sigmoidea (Gráfico 4). *M. abscessus* fue la especie más rápida, aunque no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes especies testadas.

Gráfico 4. Curvas por especies en Middlebrook 7H9.

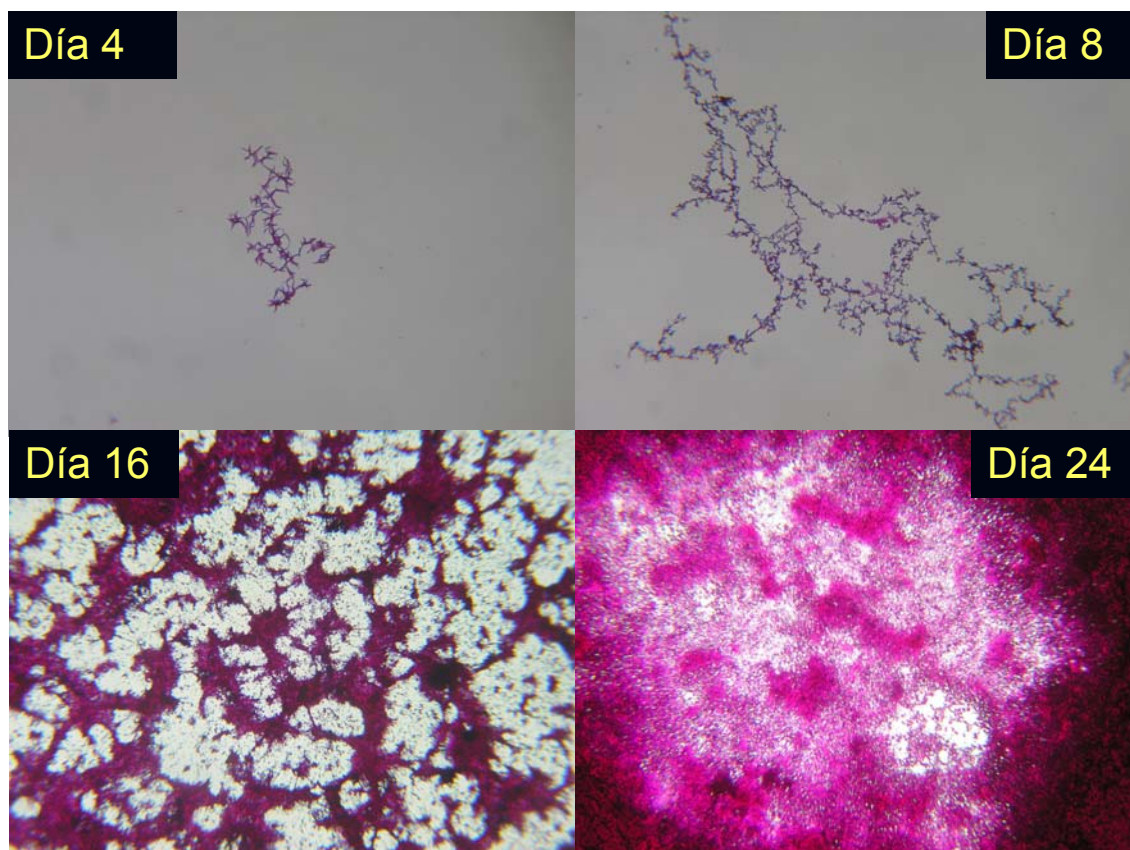


* Interpretación de la gráfica idéntica a la anterior.

Fue muy característico el crecimiento siguiendo un patrón inicial en encaje de todas las *Bacteria* (Figura 11). Este patrón desaparece conforme la biopelícula

va recubriendo la superficie del pocillo.

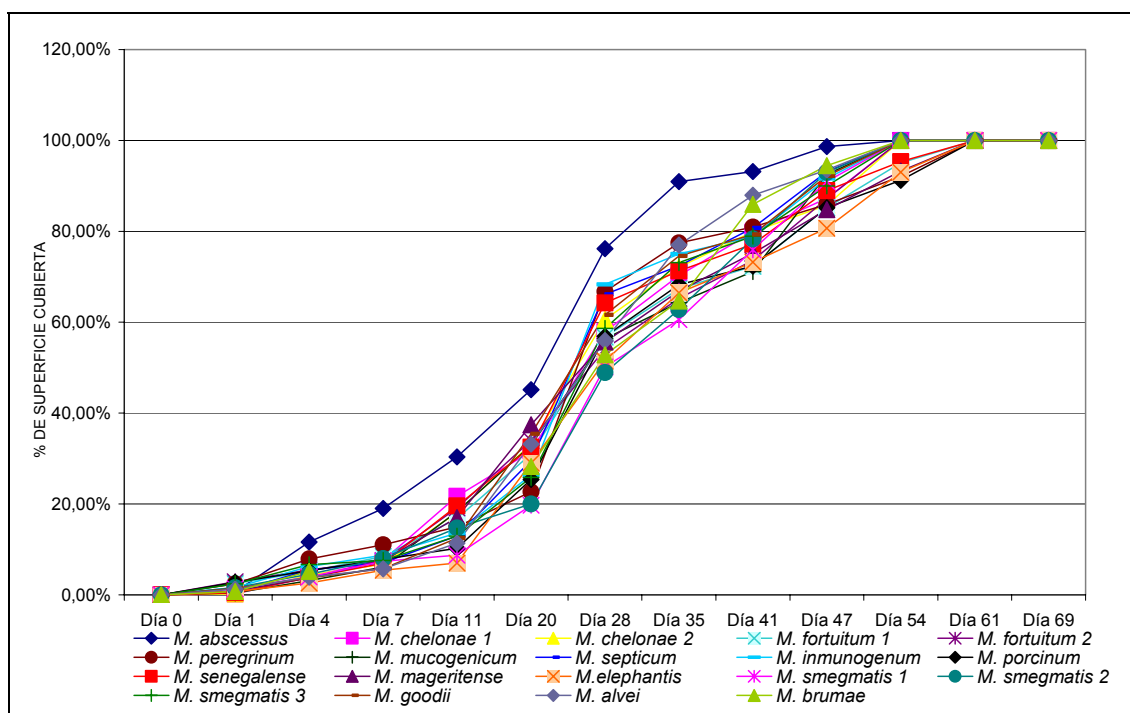
Figura 11. Morfología de la biopelícula a lo largo del tiempo.



Morfología de la biopelícula en función del tiempo. Se aprecia como el crecimiento en forma de encaje desaparece conforme aumenta la cobertura de la superficie a lo largo del tiempo. Tinción con fuchsina, 10X. Cepa de *M. fortuitum* ATCC 6841^T. Middlebrook 7H9.

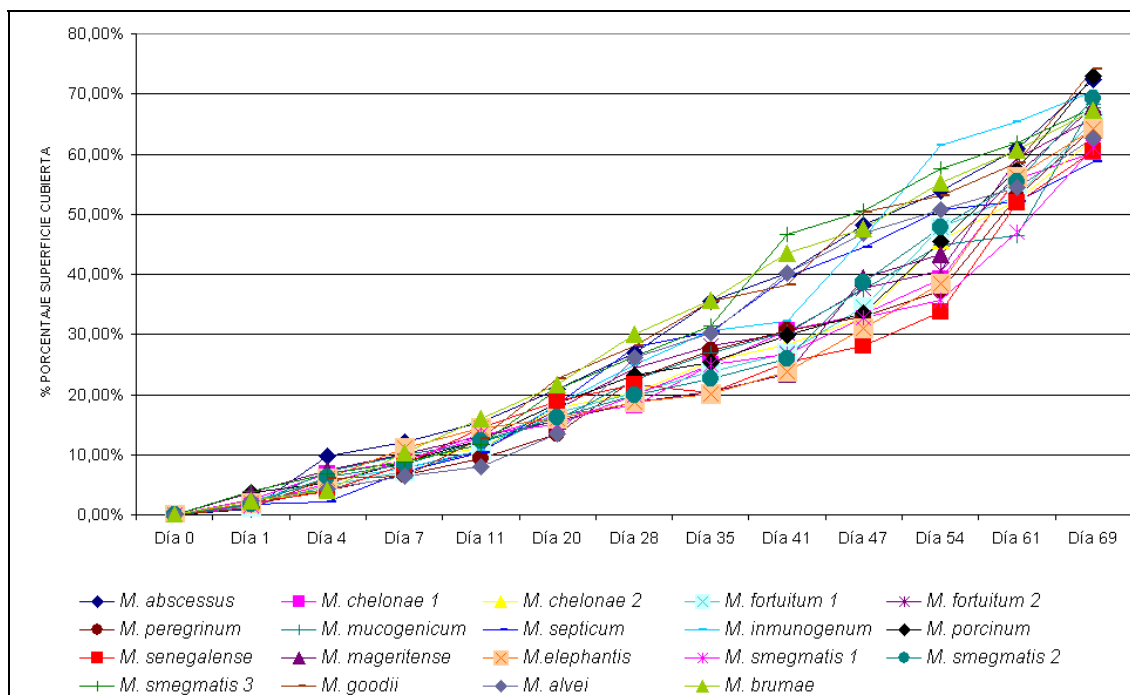
Todas las cepas mostraron un patrón de crecimiento sigmoideo utilizando agua como medio de cultivo, aunque el desarrollo fue más lento, alcanzándose el 100 % de cobertura total a los sesenta y tres días de incubación (Gráfico 5). Con PBS suplementado con un 5 % de glucosa se obtuvieron peores resultados. A Los sesenta y nueve días de incubación, ninguna de las cepas de colección había alcanzado el 100 % de superficie cubierta (Gráfico 6).

Gráfico 5. Curvas por especies en agua del grifo.



* Interpretación de la gráfica idéntica a la de movilidad.

Gráfico 6. Curvas por especies En PBS Glucosa 5%.



* Interpretación de la gráfica idéntica a la de movilidad.

El cuadro (Cuadro 16) muestra los modelos ajustados y los estimadores, columnas denominadas β_{time} y σ_{time} , del modelo aplicado.

Cuadro 16. Sumario de los modelos.

	σ_{time}	$\sigma_{residual}$	β_{time}	ψ_{type}
Middlebrook 7H9	4,63e-05	16,00	4,31	
Agua corriente	8,64e-06	7,79	1,77	9,25
PBS-5% Glucosa	0,08	3,89	0,88	
Movilidad	1,30	5,87	2,24	

La primera columna (Middlebrook 7H9, PBS-5% Glucosa y Movilidad) indica la variable, mientras que el modelo aplicado aparece en la ecuación uno. Básicamente, se trata de una línea aleatoria que pasa por el origen más un error aleatorio. La pendiente aleatoria tiene una distribución normal con una media β_{time} y una desviación estándar σ_{time} . La desviación estándar de la pendiente aleatoria de Middlebrook es casi nula y por tanto, se considera constante con una pendiente estimada en 4,31, es decir, el incremento en el área cubierta por cada día adicional es del 4,31%. De igual manera se interpretan el resto de los estimadores. El incremento medio es de 0,88 para PBS-5 % Glucosa y la desviación estándar es de 0,08. Para la movilidad la estimación es de 2,25 pero se obtuvo una mayor desviación estándar, 1,30. Las estimaciones de la desviación estándar del error aleatorio aparecen en la columna denominada $\sigma_{residual}$. Se obtuvo un valor muy grande de desviación estimada entre Middlebrook y movilidad.

Se observa que la columna correspondiente al agua del grifo tiene una columna

adicional ψ_{type} . Analizando los datos originales y utilizando un modelo lineal diferente, se deduce que el comportamiento de *M. abscessus* en agua corriente es diferente al del resto de las especies. Por tanto se introduce en el modelo una variable explicativa adicional, quedando, entonces el modelo:

$$y_{ij} = \beta_{time}t_{ij} + \psi_{type}type + b_1t_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

Donde $type = 1$ corresponde con *M. abscessus* y el cero con cualquier otra, y β_{type} es una constante. Este modelo tiene una pendiente aleatoria con una media para *M. abscessus* y otra para las demás especies. La desviación estándar es la misma para las dos especies. La media de *M. abscessus* sería $\beta_{time} + \psi_{type}$ y para las otras especies sería β_{time} siendo la desviación estándar común, σ_{time} . Finalmente se compararon los dos modelos para el agua del grifo. El valor de p indica que el modelo es significativamente distinto del modelo que considera una misma media en la pendiente aleatoria para todas las especies. El valor de p obtenido es menor de 0,0001, lo que significa que la media de la pendiente aleatoria para *M. abscessus* es significativamente distinta de las otras especies en este medio. En particular, el incremento medio por unidad de tiempo sería $1,78+9,25 = 11,02$ para *M. abscessus* y 1,77 para las otras especies. La desviación estándar sería casi nula. Se obtiene una gran desviación estándar del error, 7,79.

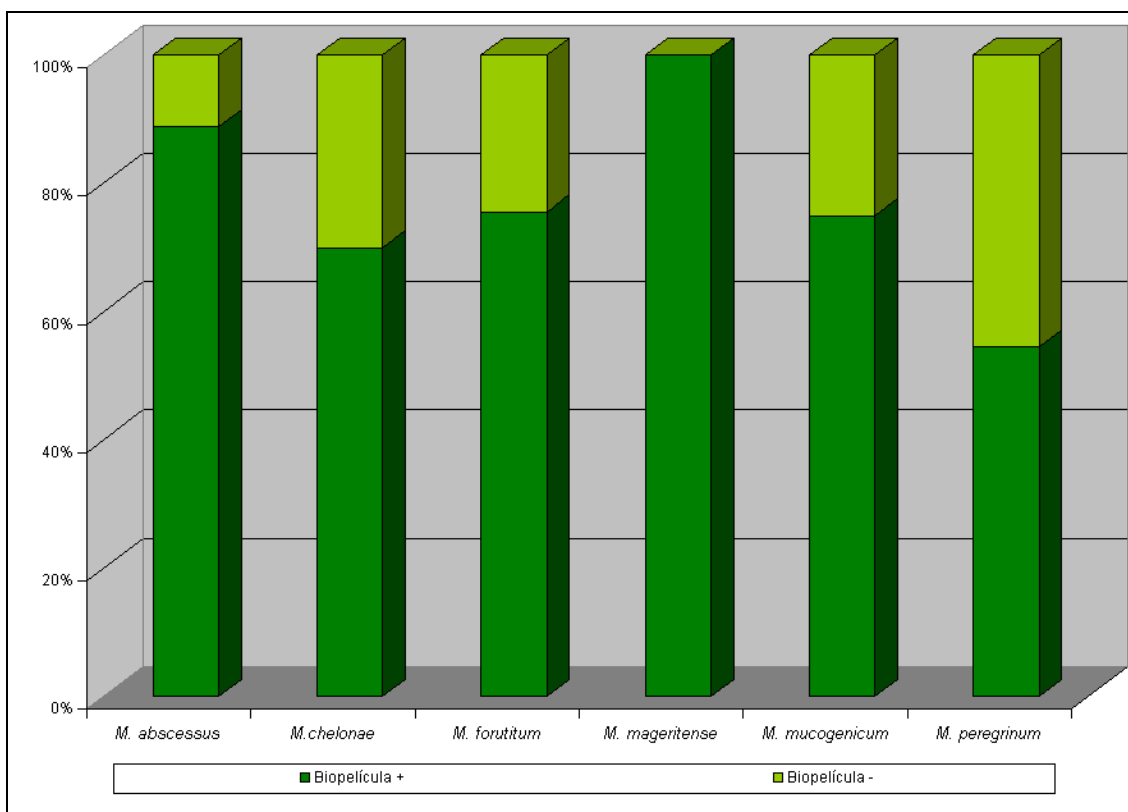
ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE MNPCR

Se analizó la capacidad para desarrollar biopelículas de ciento sesenta y ocho aislamientos clínicos de MNPCR de las siguientes especies: nueve *M. abscessus*, dos *M. alvei*, treinta *M. chelonae*, noventa *M. fortuitum*, cinco *M. mageritense*, ocho *M. mucogenicum*, veintidós *M. peregrinum*, un *M. porcinum* y un *M. septicum*. Se utilizaron como controles positivos las cepas *M. fortuitum* ATCC 6841^T, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124 y *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T. Además se estudió la cepa de colección *Mycobacterium wolinskyi* ATCC 700010^T. De las ciento sesenta y ocho cepas clínicas cuarenta y una estaban caracterizadas como clínicamente significativas.

Del total de cepas, ciento veintitrés (73,2 %) fueron capaces de formar biopelícula en las condiciones propuestas en el experimento, mientras que cuarenta y cinco (26,8 %), no fueron capaces (un *M. abscessus* (11,1 %), nueve *M. chelonae* (30 %), veintidós *M. fortuitum* (24,4 %), dos *M. mucogenicum* (25 %), diez *M. peregrinum* (45,5 %) y un *M. septicum*). De entre las especies con más de cinco aislamientos, todas las cepas de *M. mageritense* produjeron biopelículas, aunque ninguna de las cepas estudiadas era clínicamente significativa. Entre las demás especies, los porcentajes oscilaron entre el 54,5 % de *M. peregrinum* y el 88,9 % de *M. abscessus* (Grafico 7). Además todas las cepas de *M. alvei* y *M. porcinum* desarrollaron

biopelículas, pero el número de aislamientos estudiados fue demasiado pequeño como para considerar el dato como relevante.

Gráfico 7. Porcentajes de MNPCR formadoras y no formadoras de biopelículas.



Se pretende predecir la respuesta de la variable “significado clínico” utilizando las variables “especie”, “movilidad” “desarrollo de la biopelículas” y los porcentajes correspondientes a la superficie cubierta, medidos los días 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21 y 25. Teniendo en cuenta que la significación clínica es una variable categórica, hay que realizar una regresión logística donde la significación clínica es la respuesta y el resto de las variables definidas son las predictoras.

Se realizó tanto un análisis global como un análisis por especies. En el análisis global la respuesta es la significación clínica y los predictores son los porcentajes obtenidos, la biopelícula desarrollada, la movilidad y la especie, siendo interesante evaluar la hipótesis nula de un nulo efecto de cada variable predictora sobre la respuesta de las demás. Se realizó el modelo con todas las variables y el modelo sin cada una de ellas. Los valores de p observados fueron: superficie cubierta (0,0232), biopelícula desarrollada (<0,000001), movilidad (0,0037) y especie (<0,000001). Todas las variables fueron significativas menos los porcentajes que resultaron casi significativos teniendo en cuenta que realmente los porcentajes no son una única variable.

Para dos especies se realizó un paso de selección de variables. *M. chelonae* y *M. fortuitum* en el modelo final tuvieron como predictores la superficie cubierta, la movilidad y el desarrollo de la biopelícula.

La curva generada durante el desarrollo de la biopelícula en las cepas productoras a lo largo del tiempo fue de tipo sigmoideo, idéntica a la observada anteriormente (Grafico 8). No se detectaron diferencias entre las curvas de las distintas especies (Gráfico 9), aunque se apreció una gran variabilidad intraespecie e interespecie en torno a la mitad de la curva (del día siete postinoculación al día dieciocho). Estas diferencias fueron desapareciendo conforme se acercaba al final del experimento.

Gráfico 8. Curva generada por las medias por puntos de la biopelícula en cepas positiva, incluidas las desviaciones estándar.

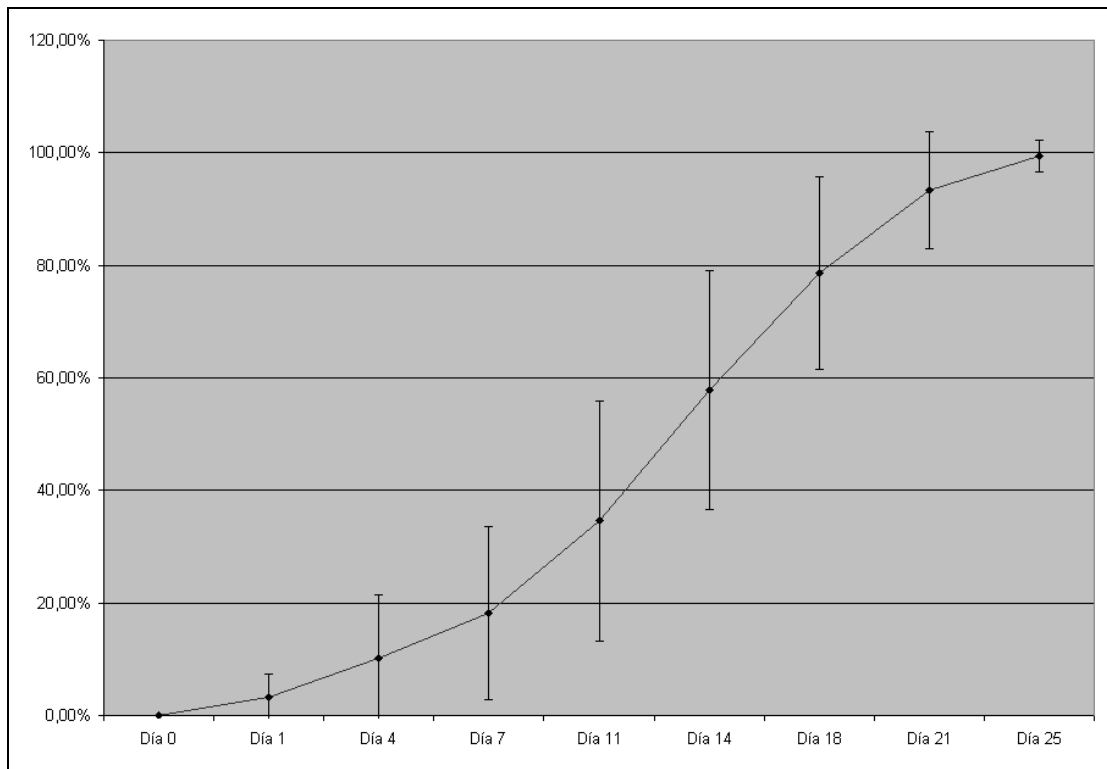
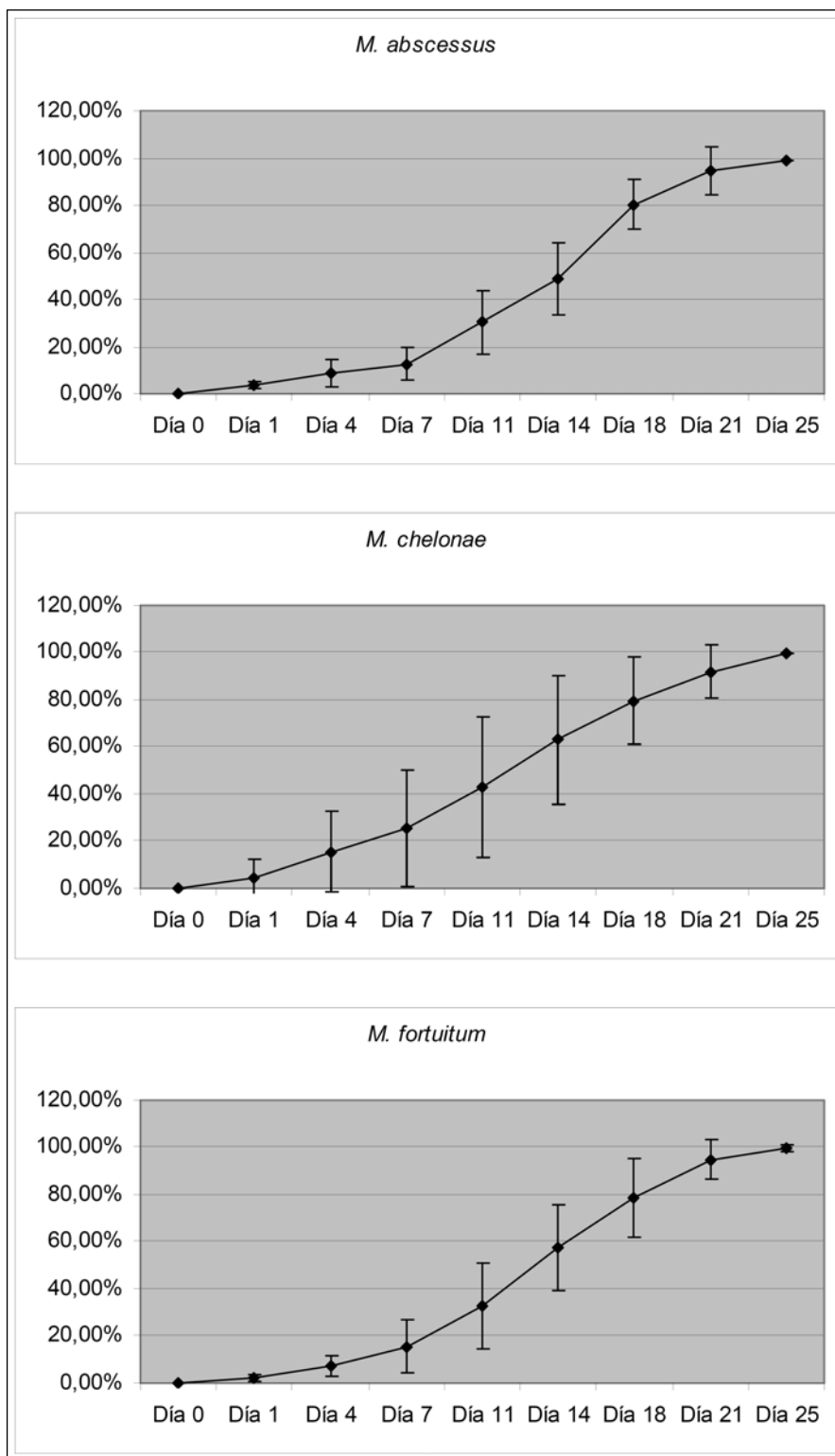
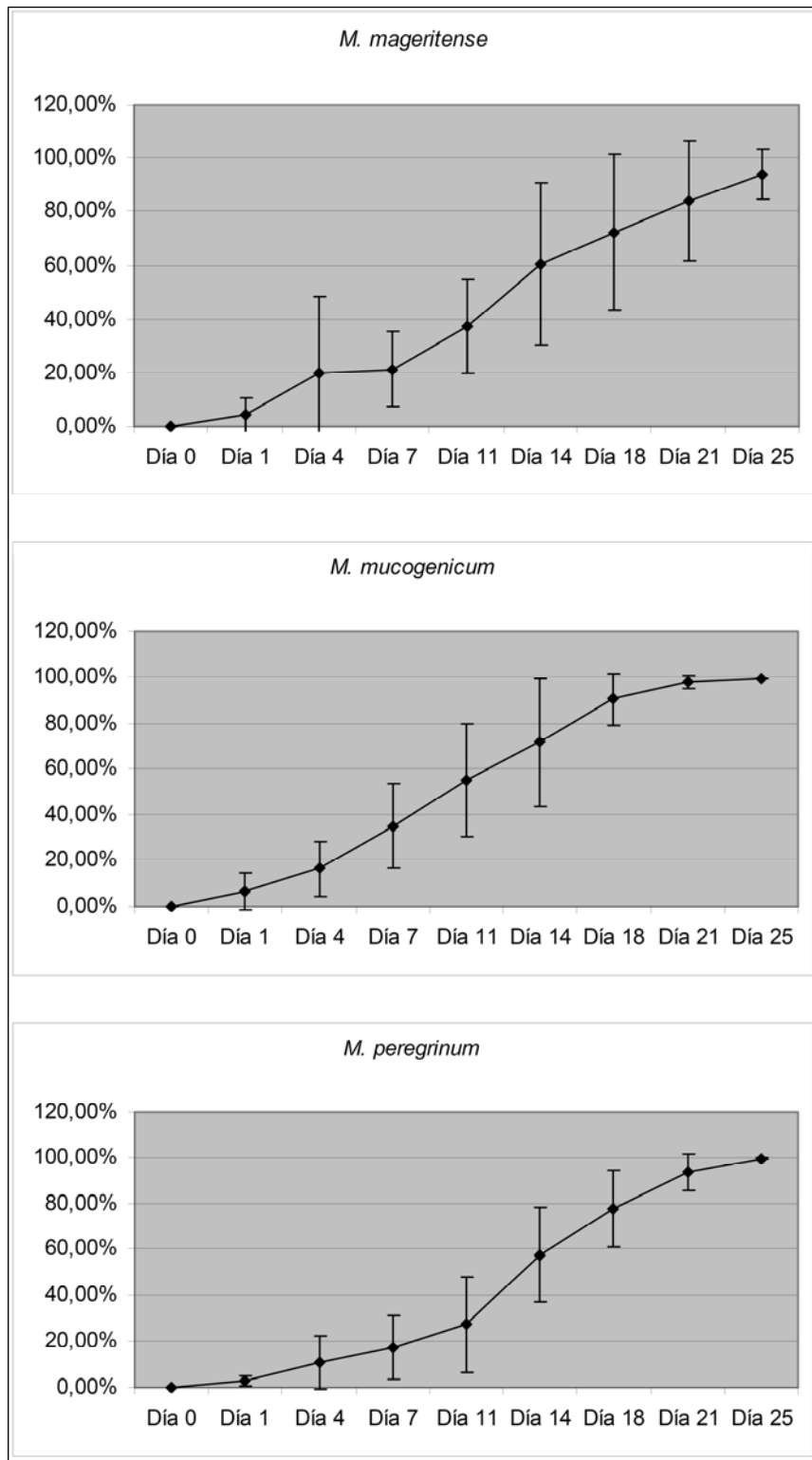


Gráfico 9. Curvas generadas durante la formación de la biopelícula con las medias de los datos y las desviaciones estándares en MNPCR.





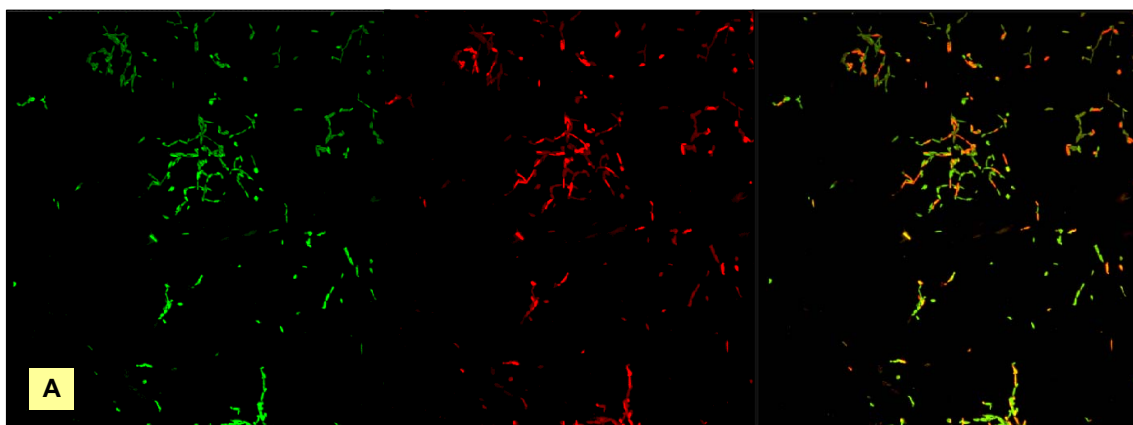
En cuanto a la movilidad de las *Bacteria* estudiadas, setenta y seis de las cepas capaces de desarrollar la biopelícula (61,8 %), presentó movilidad. Así mismo, veinticinco de las cepas incapaces de desarrollar biopelícula (55,6 %) presentaron movilidad por deslizamiento. No se halló correlación entre la movilidad y el desarrollo de biopelículas en las cepas estudiadas ($p = 0,15$). Con respecto al fenotipo (Figura 12), un 38,3 % de los aislamientos mostraron colonias rugosas, mientras que un 61,7 % mostraron colonia lisa. No se pudo establecer una significación estadística entre el fenotipo de la colonia y la movilidad ($p = 0,13$) la formación de biopelículas ($p = 0,22$). En cuanto a las especies con menos de cinco aislamientos, se pudo establecer una significación estadística en *M. peregrinum* entre el fenotipo liso y la ausencia de movilidad ($p = 0,029$), mediante el Test exacto de Fisher.

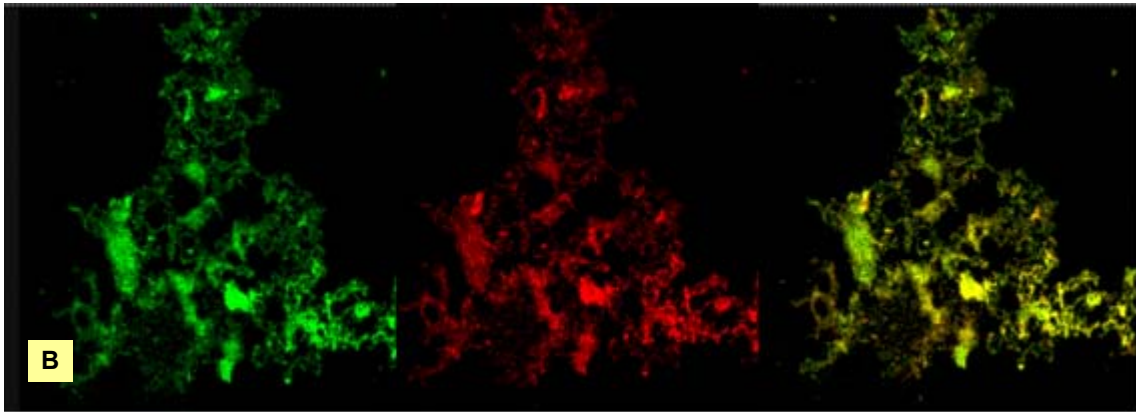
Figura 12. Fenotipo de las colonias de MNPCR.



Finalmente se confirmó la producción de biopelículas mediante CLSM. En este caso se procesaron veinte aislamientos clínicos seleccionados (cuatro *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. peregrinum* y dos *M. mucogenicum* y *M. mageritense*), además se procesaron cuatro cepas de colección: *M. fortuitum* ATCC 6841^T, *M. septicum* ATCC 700731^T, *M. smegmatis* ATCC 19420 y *M. immunogenum* ATCC 700505^T. Los patrones de crecimiento observados se correspondieron con los que se detectaron en la tinción de fuchsina (Figura 13). Se evaluó la presencia de *V Bacteria* vivas y muertas gracias a la tinción LIVE/DEAD[®], con mayor porcentaje de *Bacteria* vivas en los estratos más superficiales de la biopelícula y al comienzo de los estados de desarrollo de la misma (75-80 % de *Bacteria* vivas el día siete) que en la biopelícula madura (aproximadamente el 50 % de *Bacteria* vivas el día veinte).

Figura 13. Imágenes tomadas con CLSM de la biopelícula formada por MNPCR.

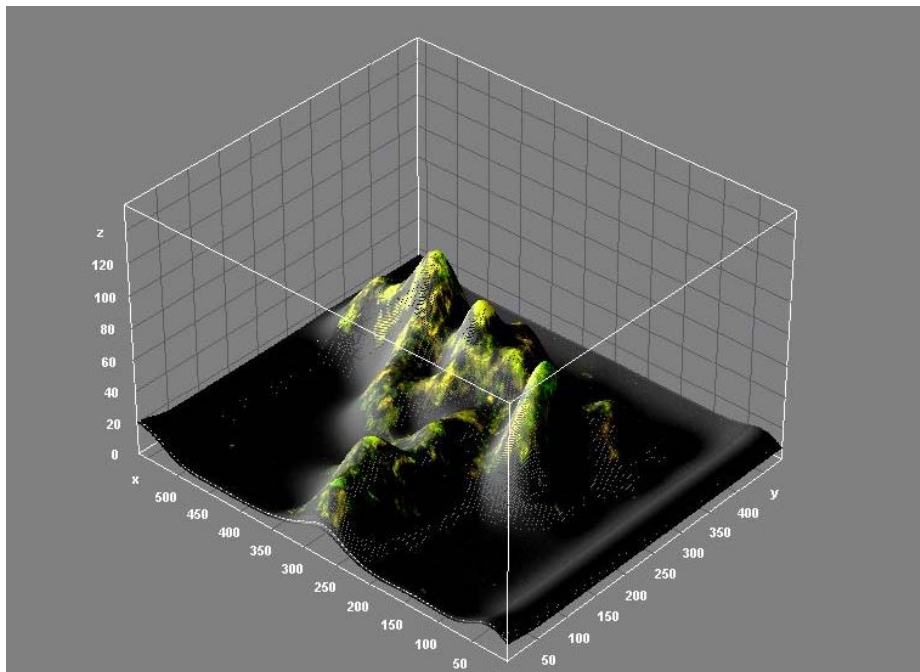




CLSM, tinción LIVE/DEAD[®]. Objetivo de 40X. A: *M. fortuitum* ATCC 6841^T, cuatro días de desarrollo de la biopelícula-. B: *M. fortuitum* ATCC 6841^T, día dieciséis de desarrollo de la biopelícula. Se puede apreciar que el desarrollo estructural de la biopelícula es similar al observado con la tinción de fucsina.

El día veinticuatro de desarrollo la biopelícula alcanzó un espesor de aproximadamente 20 μm , en todas las especies (Figura 14). Así mismo, se pudo apreciar la presencia de canales en el interior de la biopelícula.

Figura 14. Representación tridimensional de la figura 3D.



DETECCIÓN DEL GEN *groEL* EN MNPCR

Se utilizaron las siguientes cepas de colección: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841^T y ATCC 13756, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235 y ATCC 35752^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium septicum* ATCC 700731^T, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium immunogenum* ATCC 700505^T, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T, *Mycobacterium porcinum* ATCC 33776^T, *Mycobacterium senegalense* NCTC 10956^T, *Mycobacterium elephantis* DSM 44368^T, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420^T y ATCC 14468, *Mycobacterium goodii* ATCC 700504^T, *Mycobacterium alvei* ATCC 51304^T, *Mycobacterium wolinskyi* ATCC 700010^T y *Mycobacterium brumae* ATCC 51384^T. Además se analizaron los ciento setenta aislamientos clínicos totales (nueve *M. abscessus*, dos *M. alvei*, treinta y tres *M. chelonae*, ochenta y nueve *M. fortuitum*, cinco *M. mageritense*, ocho *M. mucogenicum*, veintidós *M. peregrinum*, un *M. porcinum* y un *M. septicum*).

Todas las cepas de colección dieron resultados positivos en la detección genética para el gen *groEL*, con la excepción de *M. fortuitum* ATCC 13756, única cepa del total con resultado negativo, ya que todos los aislamientos clínicos fueron positivos.

La secuenciación genética de los amplicones determinó un porcentaje de similitud de un 88 % a un 98 % entre las secuencias obtenidas y la secuencia nucleotídica del mismo gen de *M. smegmatis* y de un 87 % a un 88 % con el mismo gen de *M. abscessus*, independientemente de la especie analizada.

EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN RACIÓ ANTIBIÓTICA EN LAS BIOPELÍCULAS

En este estudio se utilizaron veinte cepas procedentes de aislamientos clínicos: cuatro *M. abscessus*, cuatro *M. chelonae*, cuatro *M. fortuitum*, cuatro *M. peregrinum*, dos *M. mucogenicum* y dos *M. mageritense*. Dentro de las cepas de colección, se estudiaron las cepas tipo de seis especies de MNPCR: *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841^T, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467^T, *Mycobacterium abscessus* DSM 44196^T, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124 y *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351^T.

Una vez realizados los experimentos de formación de biopelículas, se seleccionaron cepas con dicha capacidad. Así mismo, se estudiaron sus CMI (Cuadro 17) como se ha descrito anteriormente.

Cuadro 17. CMI de las cepas seleccionadas para el estudio.

Especie Cepa		CLA	CIP	AK
<i>M. abscessus</i>	FJD-64	0,25	≤0,03	1
<i>M. abscessus</i>	Cepa tipo	1	2	8
<i>M. abscessus</i>	FJD-193	≤0,03	≤0,03	0,25
<i>M. abscessus</i>	MCM-25	≤0,03	8	0,5
<i>M. abscessus</i>	FJD-70	≤0,03	4	16
<i>M. chelonae</i>	FJD-4	2	0,25	0,06
<i>M. chelonae</i>	Cepa tipo	0,06	0,06	16
<i>M. chelonae</i>	MCM-30	2	0,06	0,12
<i>M. chelonae</i>	MCM-32	0,25	4	0,12
<i>M. chelonae</i>	MCM-52	0,06	4	>64
<i>M. fortuitum</i>	FJD-22	0,12	0,12	0,5
<i>M. fortuitum</i>	Cepa tipo	2	≤0,03	1
<i>M. fortuitum</i>	FJD-206	0,12	0,25	1
<i>M. fortuitum</i>	FJD-207	0,25	≤0,03	2
<i>M. fortuitum</i>	MCM-75	0,12	≤0,03	0,5

<i>M. mageritense</i>	Cepa tipo	16	0,12	0,5
<i>M. mageritense</i>	MCM-45	>64	0,12	>64
<i>M. mageritense</i>	MCM-69	2	0,25	1
<i>M. mucogenicum</i>	FJD-19	≤0,03	0,25	0,5
<i>M. mucogenicum</i>	Cepa tipo	0,25	1	2
<i>M. mucogenicum</i>	MCM-18	≤0,03	0,12	1
<i>M. peregrinum</i>	FJD-15	0,25	0,06	0,06
<i>M. peregrinum</i>	FJD-81	2	≤0,03	0,12
<i>M. peregrinum</i>	Cepa tipo	2	≤0,03	0,12
<i>M. peregrinum</i>	FJD-213	0,06	≤0,03	0,06
<i>M. peregrinum</i>	MCM-12	0,12	≤0,03	1

FJD: cepas procedentes de la Fundación Jiménez Díaz.
MCM: cepas procedentes del Estudio Multicéntrico de Madrid.
CLA: claritromicina; CIP: ciprofloxacino, AK: amicacina.

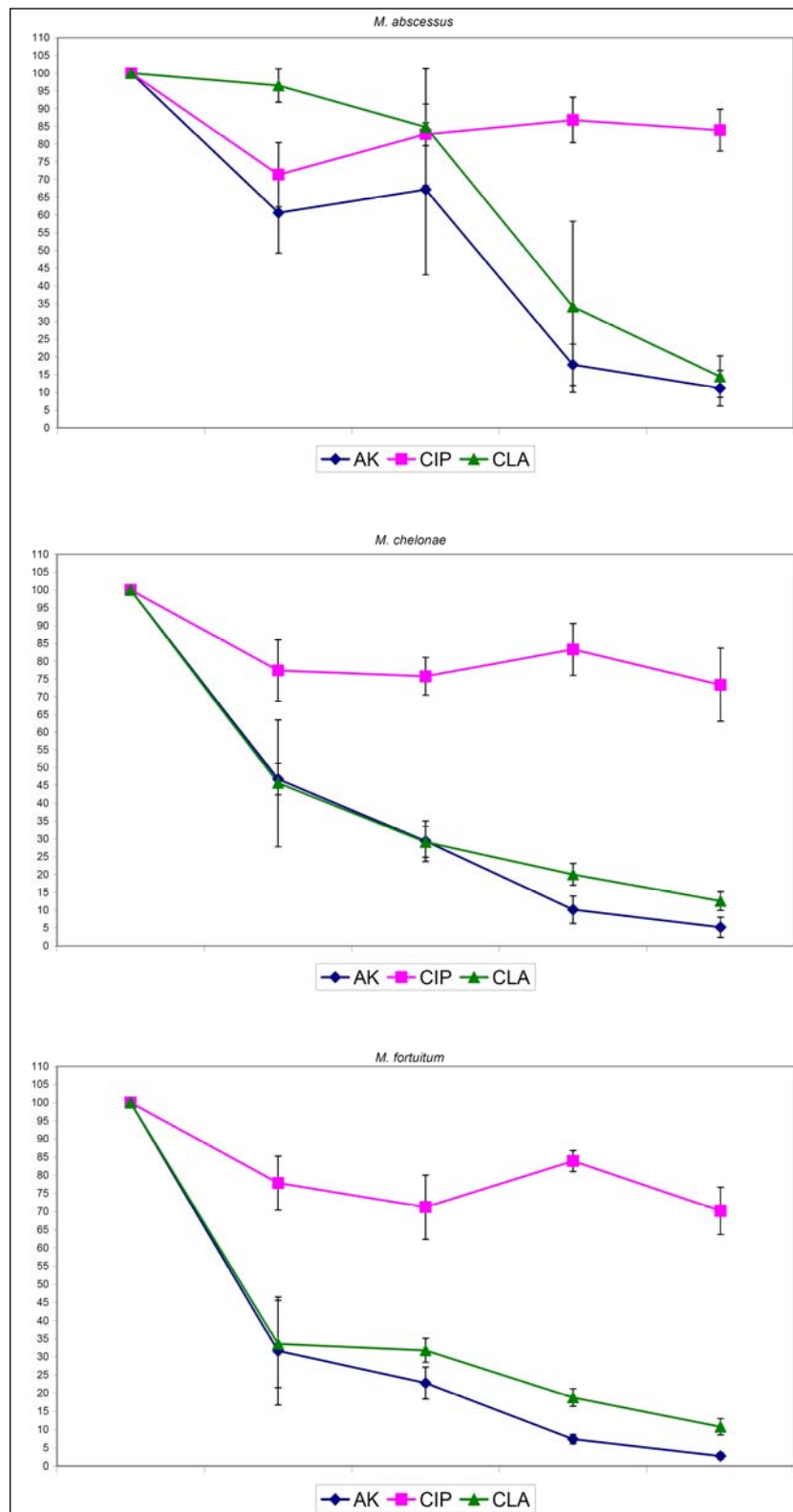
Con los datos obtenidos, se generaron curvas de penetración del antibiótico en la biopelícula (Gráfico 10) por especies. Del estudio de dichas curvas se deduce que el antibiótico que mejor penetra en la estructura de la biopelícula es la amicacina, con una media de 5,7 % de antibiótico restante en disco, en relación con el control negativo, tras cuarenta y ocho horas de experimentación. Para la claritromicina, el porcentaje fue del 25,39 %. El ciprofloxacino tiene una escasa penetración en la biopelícula, con un porcentaje del 75,01%. Estos datos se repiten en todas las cepas independientemente de la sensibilidad antibiótica. Como puede observarse, sin embargo, existen diferencias entre las especies en el patrón seguido. El gráfico siguiente (Gráfico 11) representa las curvas comparativas de penetración de los antibióticos entre especies.

Tras cuarenta y ocho horas de incubación, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para *M. abscessus* respecto a la cantidad de antibiótico remanente en el disco de la amicacina, comparándolos con *M.*

chelonae ($p = 0,048$), *M. fortuitum* ($p = 0,009$), *M. peregrinum* ($p = 0,0082$) y *M. mageritense* ($p = 0,025$). También hubo diferencias significativas entre *M. fortuitum* y *M. mucogenicum* ($p = 0,021$), *M. fortuitum* y *M. mageritense* ($p = 0,0088$), *M. peregrinum* y *M. mucogenicum* ($p = 0,0017$) y *M. peregrinum* y *M. mageritense* ($p = 0,0002$). En cuanto al ciprofloxacino, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre *M. abscessus* y *M. fortuitum* ($p = 0,0079$), *M. peregrinum* ($p = 0,002$), *M. mucogenicum* ($p = 0,0019$) y *M. mageritense* ($p = 0,0045$). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre *M. peregrinum* y *M. abscessus* ($p = 0,0088$), *M. chelonae* ($p = 0,009$), *M. fortuitum* ($p = 0,04$), *M. mucogenicum* ($p = 0,035$) y *M. mageritense* ($p = 0,025$) para la claritromicina.

De las curvas se puede deducir que la claritromicina y la amicacina penetran rápidamente en las biopelículas formadas, con la excepción de las biopelículas de *M. abscessus* (ambos casos) y de *M. mageritense* y de *M. mucogenicum* para la claritromicina. El porcentaje de penetración de la claritromicina a las seis horas de experimentación fue del 26,2 % al 31,8 %, con la excepción de *M. mucogenicum* (39,3 %), *M. mageritense* (71,6 %) y *M. abscessus* (84,9 %). El porcentaje de penetración de la amicacina a las seis horas de experimentación fue de 22,8 % a 36,4 %, con la excepción de *M. abscessus* (67,2 %). La penetración antibiótica varía en velocidad en función de la especie, a pesar de que los resultados finales a las cuarenta y ocho horas son equiparables. Estas diferencias no se apreciaron en el experimento con el ciprofloxacino.

Gráfico 10 Curvas de penetración por especies.



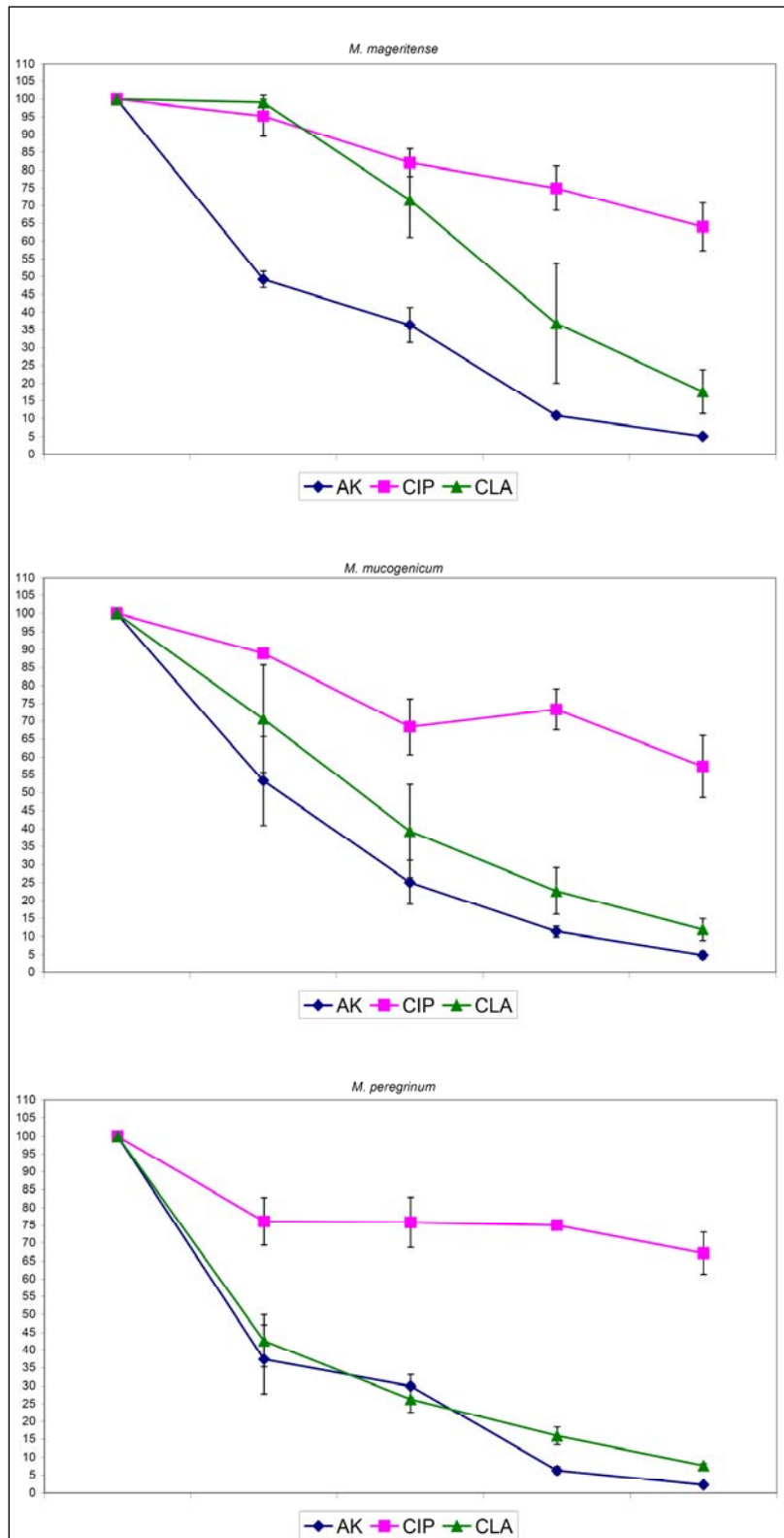
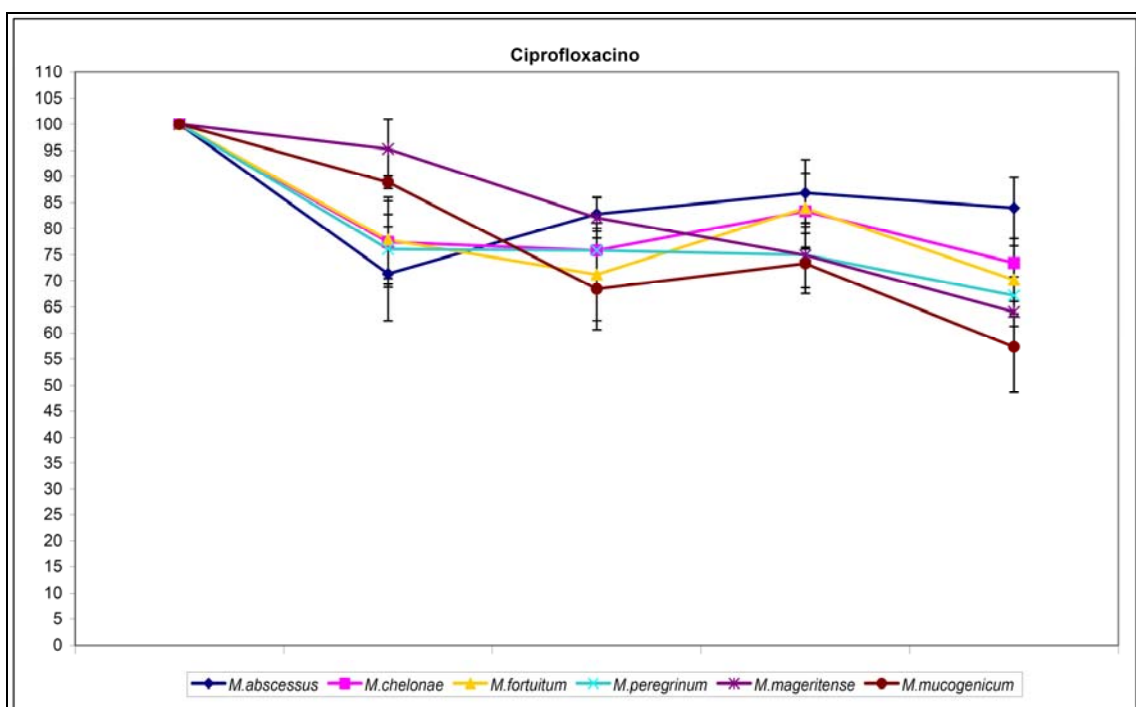
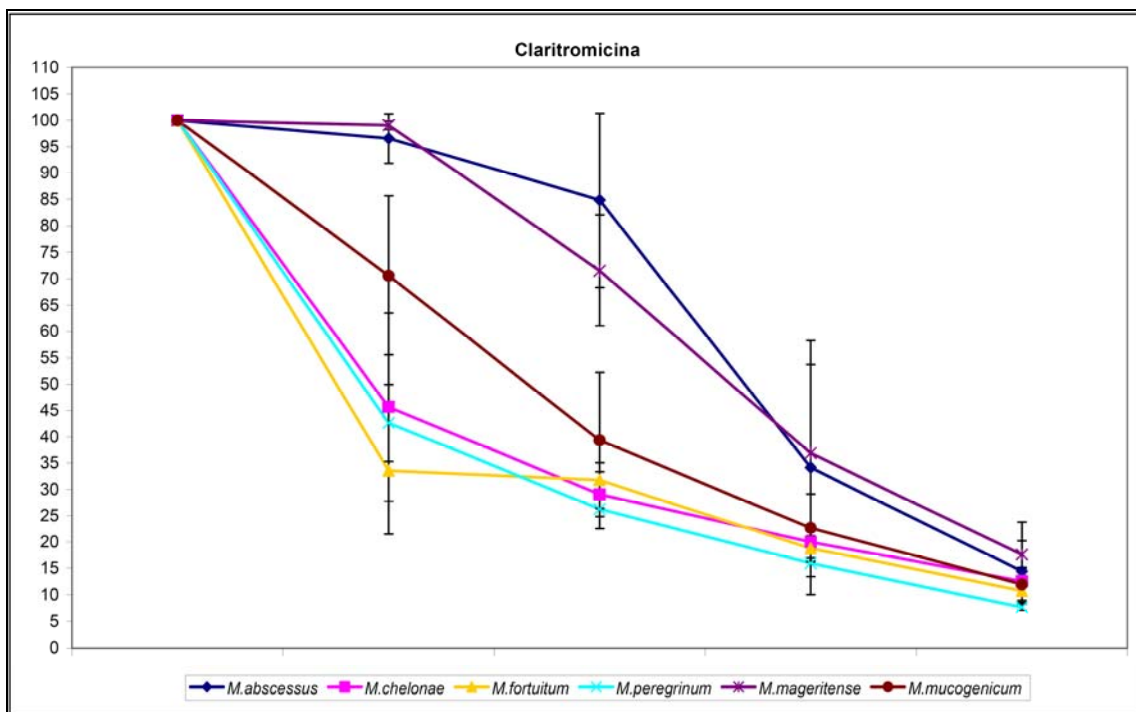
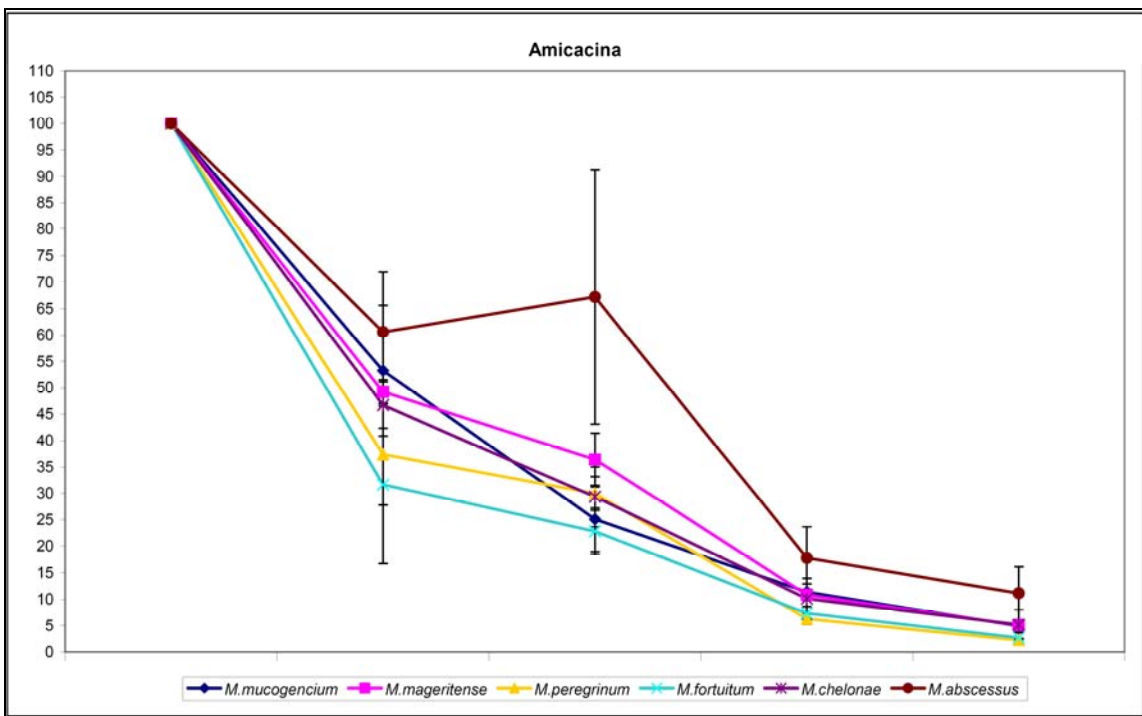


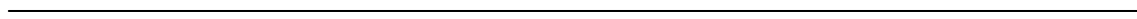
Gráfico 11. Curvas de penetración de los diferentes antibióticos para la comparación entre las especies.







DISCUSIÓN



Aunque las infecciones causadas por MNPCR son infrecuentes pueden llegar a ser de consecuencias devastadoras sobre todo cuando se trata de infecciones nosocomiales ^{36,336}, principalmente por su resistencia a los tratamientos antimicrobianos ^{198,361}. Existen evidencias epidemiológicas sobre el papel de diversos factores de riesgo en relación con la capacidad de estas micobacterias de producir enfermedades en humanos. Muchas de las infecciones humanas causadas por MNPCR están asociadas con la presencia de cuerpos extraños como catéteres, hilos de suturas o prótesis ^{148,336,342}, lo que podría sugerir que la adherencia a superficies es importante para el desarrollo de la infección en humanos. La dificultad de suprimir estas *Bacteria* del cuerpo extraño se debe a que pueden formar biopelículas ¹⁴². A pesar de esto existen muy pocos estudios *in vitro* sobre mecanismos de patogenicidad específicos de MNPCR. Hay que añadir, además, que los resultados están condicionados por el tamaño de las muestras analizadas, muy pequeñas en la mayoría de los trabajos *in vitro* sobre patogenia de las MNPCR, muchos de los cuales están realizados solamente con cepas de colección ^{53,108,158}. Una limitación del presente estudio es la distribución de las especies a estudiar en nuestra área geográfica, donde hay una escasa representación de las especies *M. abscessus*, *M. peregrinum* y *M. mucogenicum*, menos comunes en los aislamientos clínicos que las especies *M. fortuitum* y *M. chelonae* ^{36,39,100,347}, provocando que el tamaño muestral sea irregular, siendo muy pequeño el de algunas especies. En ese sentido, es de destacar que las pruebas bioquímicas pueden no ser

suficientes para una correcta identificación a nivel de especie, por lo que es necesario complementarlas con diversas técnicas moleculares ¹⁰⁵, como el PRA. Otras técnicas moleculares, como el RAPD, son de gran utilidad en los estudios epidemiológicos, ya que conocer tanto las diferencias en la epidemiología, sensibilidad antimicrobiana, e incluso en el significado clínico de los aislamientos, hace posible un mejor conocimiento de las especies en relación con su capacidad de infección humana y por tanto de su posible tratamiento ³³³. Tanto el PRA como el RAPD son técnicas relativamente fáciles, con una interpretación relativamente sencilla y que requieren poco aparataje, por lo que son accesibles a numerosos laboratorios de micobacteriología clínica.

Las actuales diferencias entre las distintas especies de MNPCR no son solo taxonómicas sino también clínicas y epidemiológicas ^{36,39,100,347}, así, por ejemplo, *M. chelonae* es más común en Europa ³⁴⁷, mientras que *M. abscessus* se aísla con mayor frecuencia en América ³⁹. *M. chelonae* causa enfermedades de la piel y tejidos blandos, así como infecciones nosocomiales en cirugía ocular ³⁹, y parece presentar más resistencias a antibióticos que la mayoría de especies de MNPCR ³⁴⁴. Por otra parte *M. fortuitum* es causante de diferentes enfermedades respiratorias y cutáneas en la comunidad, así como un amplio espectro de infecciones nosocomiales, algunas de ellas relacionadas con la cirugía plástica y cardíaca ^{36,39,347}. Al ser todas ellas *Bacteria* ambientales, pueden vivir en el suelo o en el agua, y se han encontrado formando biopelículas en los canales de los sistemas de agua ^{52,60,112,191,284,290,324}. Por

tanto el agua corriente puede contener MNPCR, la inmensa mayoría de las veces no patógenas para los seres vivos que entran en contacto con ellas. La epidemiología de estas micobacterias demuestra que las cepas que causan infecciones no están relacionadas entre sí, de modo que la transmisión no se realizaría de persona a persona ^{100,192}. En otros casos en los que estos organismos han aparecido causando brotes y pseudobrotes epidémicos se ha conseguido demostrar la presencia de un origen común para las micobacterias en diversas fuentes ambientales, incluyendo el agua del grifo, hielo, soluciones desinfectantes e, incluso, soluciones de antibióticos contaminadas ³⁴³. En un estudio sobre la incidencia de MNPCR a lo largo de un periodo de varios años, se detectó un pico de infecciones causadas por diversas especies de estos organismos ¹⁰⁰; pese a que las razones son todavía desconocidas, dicho pico coincide con un periodo de sequía ¹⁴⁴, donde las reservas de agua de los embalses disminuyen y las características poblacionales de las MNPCR que se encontrasen en dicho entorno podrían cambiar. Parece, entonces, que la fuente de los aislamientos de MNPCR es ambiental, tanto si tienen significado clínico como si carecen de él.

Dentro de las cepas clínicamente significativas obtenidas en nuestro estudio, aparecen pocos casos de infecciones respiratorias causadas por MNPCR, descritas sin embargo como frecuentes en la literatura ^{36,90,139}. La mayor parte de los aislamientos respiratorios fueron considerados como no significativos de acuerdo con los criterios establecidos por la American Thoracic Society ³³⁷. Solamente siete casos mostraron gran cantidad de bacilos y cultivos positivos

repetidos en esputos y lavados bronquiales.

Otros dos aislamientos se obtuvieron de pacientes con prótesis traqueales sin síntomas de infección. La eliminación de la prótesis hizo desaparecer la micobacteria, y en uno de estos casos se obtuvo una elevada cantidad de micobacterias en el cultivo. Estos casos de pseudoinfección también están descritos en la literatura ¹¹, dando lugar en ocasiones un diagnóstico erróneo de tuberculosis.

En los aislamientos clínicamente significativos de este estudio prevalece la infección de piel y tejidos blandos, destacando la foliculitis en varios pacientes, sin factores de riesgo anteriores a la infección salvo el antecedente de depilación a la cera fría ⁹⁶. Estas infecciones secundarias a tratamientos cosméticos están ampliamente descritas en la literatura ^{1,36,216,297,353}. También se detectaron casos de infección de herida quirúrgica ^{36,343,345,347}. En los pacientes de infección relacionada con la presencia de cuerpos extraños, fue necesaria la retirada de los mismos para conseguir su curación.

M. abscessus aparece en nuestro estudio como la especie mayormente relacionada con significación clínica, tras la cual se encuentran *M. chelonae* y *M. fortuitum* ^{77,139,145,246} aunque debido a las variaciones poblacionales comentadas, se obtuvieron más casos de *M. chelonae* o *M. fortuitum* que de *M. abscessus*. En relación con el resto de especies, en nuestro estudio detectamos tan solo una cepa de *M. peregrinum* clínicamente significativa. Las cepas obtenidas en aislamientos repetidos de pacientes con fibrosis quística mostraron diferentes perfiles en el RAPD, hecho no descrito anteriormente ¹⁷²,

posiblemente debido a la presencia en el tracto respiratorio de diferentes clones, característica descrita para otras micobacterias ^{127,186}. A pesar de que la infección nosocomial es predominante, no se han detectado brotes ni casos de transmisión entre humanos, aunque sí un pseudobrote por contaminación cruzada. Dado que el significado clínico de las distintas especies es variable, es presumible que deben existir factores de patogenicidad en las distintas especies que hacen que algunas de ellas causen infecciones en humanos con mayor frecuencia, mientras que otras sean predominantemente colonizadores o contaminantes.

El tratamiento de las infecciones causadas por micobacterias de crecimiento rápido es distinto que el del resto de micobacterias, siendo muy diferente del tratamiento de la tuberculosis. La sensibilidad *in vitro* de las MNPCR demuestra que son resistentes a los tuberculostáticos convencionales pero sensibles a otros antibióticos de uso más amplio ^{36,336,349}. Como la sensibilidad de estos microorganismos no es uniforme, es necesario el estudio individualizado de la misma ^{283,344}, aunque los estudios amplios permiten orientar el tratamiento empírico de estas infecciones mediante el conocimiento global de la sensibilidad de los organismos en áreas geográficas específicas ^{114,115,308,361}. El método de microdilución en placa es la técnica de referencia, pero es de difícil realización por parte de la mayoría de laboratorios asistenciales, por lo que se ha intentado sustituir por la técnica de difusión disco placa, con escasos resultados ¹⁰¹. También se ha estudiado el E-test con el mismo fin ^{29,155,181,205}, pero presenta problemas de reproducibilidad

³⁵⁷, aunque es la mejor alternativa en laboratorios clínicos. En el caso de la tigeciclina, el E-test ha sido utilizado con buenos resultados en otras *Bacteria* ³², aunque en nuestro estudio con MNPCR presenta grandes diferencias con respecto a la CMI obtenida por microdilución, si bien la ausencia de cepas resistentes no permite establecer su utilidad en cuanto a delimitar si la cepa es sensible o resistente ^{115,205}. En el estudio realizado mediante la técnica de referencia hemos obtenido como resultados globales que *M. peregrinum* es la especie más susceptible, mientras que *M. chelonae* y *M. abscessus* son las más resistentes, coincidiendo en este dato con estudios anteriores ^{36,77,114}. Así mismo, los resultados de sensibilidad obtenidos para el resto de las especies coinciden con otros con otros estudios publicados ^{36,77,114}. Hay una buena actividad de las quinolonas frente a *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum* y *M. mageritense*, aunque es menor en *M. chelonae* ^{36,41,77,114}, con la excepción del ciprofloxacino. La actividad de las quinolonas frente a *M. abscessus* es escasa. La actividad de la amicacina frente a MNPCR fue similar a la descrita en la literatura ^{36,77,114}, con la salvedad de las tres cepas resistentes y las dos cepas de sensibilidad intermedia anteriormente mencionadas ¹¹⁵.

Aunque algunos estudios muestran que la cefoxitina y la doxiciclina son activos en infecciones causadas *M. fortuitum* ³⁴⁶, en nuestro caso hemos detectado gran cantidad de cepas resistentes o de sensibilidad intermedia ^{115,181}. Los resultados obtenidos para el resto de las especies frente a estos antibióticos han sido muy variables.

La actividad de los macrólidos es asimismo muy variable. La actividad de la claritromicina y la azitromicina parece mejor que la de la eritromicina^{339,349,361}, siendo las CMI's de la claritromicina las más bajas, en especial para *M. chelonae*. Todos ellos presentan peor actividad frente a *M. fortuitum*.

A la luz de los datos obtenidos, en nuestra área geográfica, se podrían tratar empíricamente las infecciones causadas por *M. fortuitum* y *M. peregrinum* con el ciprofloxacino, asociado o no a la amicacina. Así mismo, las infecciones causadas por *M. chelonae* o *M. abscessus* podrían ser tratadas con la claritromicina, igualmente asociada o no al aminoglucósido citado. El resto de las especies necesitarían el estudio de un número mayor de cepas para ser concluyentes.

La actividad *in vitro* de la tigeciclina ha sido buena, aunque no se han podido interpretar los resultados por falta de puntos de corte específicos para MNPCR, que si aparecen en otras especies. La tigeciclina muestra una buena actividad frente a otras *Bacteria* Gram positivas y Gram negativas^{34,239}, pero hay pocos datos sobre su actividad frente a MNPCR³⁴⁰. Se necesitarían más estudios para comprobar su eficacia real frente a infecciones causadas por estas *Bacteria*. Aunque las CMI's para la tigeciclina podrían sugerir la falta de mecanismos de resistencia hacia este antibiótico por parte de las MNPCR, existen mecanismos de resistencia a otras tetraciclinas^{4,30,40,80,340}. Si existen mecanismos de resistencia frente a este antibiótico en otras especies⁴⁰.

En relación con el tratamiento, es de destacar que los pacientes con infecciones leves de piel y partes blandas fueron tratados con monoterapia

en la mayoría de los casos, obteniendo la curación de todos ellos. Aunque la aparición de resistencias en caso de monoterapia ha sido descrita como uno de los riesgos de esta práctica ³¹² probablemente la eficacia *in vitro* de los antimicrobianos empleados, junto con el relativamente bajo número de *Bacteria* presentes podría explicar la ausencia de mutantes resistentes.

Un grave problema en el tratamiento de las infecciones causadas por las MNPCR es, al igual que el resto de las *Bacteria*, la aparición de multitud de mecanismos de resistencia estudiados durante años especialmente en *Streptococcus spp.* ³⁰⁶. Como se ha comentado anteriormente, la aparición de estas resistencias se ha evidenciado en el estudio de sensibilidad realizado, independientemente de la especie estudiada.

En el caso de los macrólidos, podemos destacar entre los distintos mecanismos la resistencia mediada por genes, que codifican proteínas de muy diverso tipo ^{221,271}. La resistencia constitutiva a estos antibióticos de *M. tuberculosis* es bien conocida, aunque los mecanismos genéticos se conocen desde hace poco tiempo ^{9,200}. Por otra parte, dado que las infecciones causadas por MNPCR se tratan con frecuencia con dichos antibióticos, es importante estudiar la familia de genes *erm*. Las ARNr metilasas constituyen el mecanismo de resistencia más importante frente a los macrólidos presentes tanto en *Bacteria* Gram positivas como Gram negativas ^{273,306}, incluyendo géneros cercanos a *Mycobacterium* como es *Corynebacterium* ²⁷³ y se han descrito tanto en *M. fortuitum* como en *M. smegmatis* ^{201,224}. Se conoce la presencia del *erm(37)*, aunque se han descubierto otras metilasas en otras

especies de micobacterias, incluyendo MNPCR²²³. Se ha descrito la aparición de resistencias a los macrólidos durante la monoterapia en infecciones causadas por *M. chelonae*, producidas por una mutación en el gen que codifica para el 23S ARNr^{224,247,248}. Recientemente se han descrito *erm* metilasas en *M. boenickei*, *M. houstonense*, *M. goodii*, *M. neworleansense*, *M. porcinum*, *M. wolinskyi*, *M. fortuitum* y *M. smegmatis*²²³. Al ser genes inducibles^{201,224}, en muchos casos el estudio de susceptibilidad *in vitro* puede detectar CMI's bajas a estos antibióticos, aunque la cepa pueda aparecer como resistente tras la inducción con los mismos a concentraciones subinhibitorias. En nuestro estudio hemos detectado con relativa frecuencia, casos con cepas de baja CMI y presencia de genes *erm*. Aunque también cabe la posibilidad que el gen esté mutado, delecionado o que haya problemas en la regulación de la expresión del mismo, como explicación a la discrepancia entre el estudio convencional y la detección de estos genes. En nuestro caso, se han utilizado unos cebadores de consenso para la familia de genes *erm* descritos, con una sensibilidad no especificada, por lo que puede que no detecten todos los genes de la familia, ya que puede haber hasta un 68 % de diferencia entre las secuencias aminoacídicas de los mismos²²³. La falta de genes *erm* en cepas con una alta CMI podría deberse a baja sensibilidad en la detección de los cebadores utilizados o a la presencia de otros mecanismos de resistencia a los macrólidos, como son la presencia de mutaciones en el gen que codifica para el dominio V del 23S ARNr o en los genes que codifican para las proteínas ribosomales L4 y L22, descritas en otras especies^{27,221}.

En el estudio, tanto de cepas clínicas como de colección, han sido detectadas estas metilinas en especies que no estaban descritas como poseedoras de genes *erm*: *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. peregrinum*²²³; además se han detectado en especies no estudiadas previamente como son *M. alvei* y *M. septicum*. La secuenciación de los fragmentos obtenidos, confirmó los resultados de la PCR. El caso de *M. abscessus* es de especial interés porque estos genes no se han detectado en ningún aislamiento de los estudiados anteriormente²²³, y no ha sido posible detectar genes *erm* ortólogos a los de otras MNPCR en la secuenciación completa del cromosoma de la cepa tipo de la especie (Genbank: CU458896). La cepa de colección utilizada en el estudio también fue negativa^{59,223}. Varias causas podrían explicar estos datos discrepantes: se sabe que hay diferencias locales y regionales entre las diferentes cepas, además de en otros datos concernientes a la epidemiología de las micobacterias. Además, existen datos recientes que aseveran que las cepas de colección tienden a perder información genética, en especial la referente a mecanismos de resistencia, durante la manipulación en el laboratorio, así como tras largos periodos a baja temperatura^{59,100}. Estas pérdidas son menos frecuentes en los aislamientos clínicos⁵⁹. Los estudios realizados con MNPCR para detectar estos genes tiene el inconveniente, por otra parte bastante frecuente, de haber sido realizados con pocas cepas clínicas y muchas de colección²²³, lo que podría dar resultados no extrapolables al contexto clínico real.

La presencia de estos genes es variable en función de las especies, siendo

más frecuente en aquellas con mayor relevancia clínica, es decir, *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*, además de *M. mageritense*, donde parecen ser también constitutivas ²²³. Es extremadamente importante el estudio de estos genes, ya que los macrólidos forman parte esencial de la terapia frente a *M. chelonae* y *M. abscessus* ^{36,77,311}, además de que, al ser inducibles y no correlacionarse la CMI obtenida con la realidad, la monoterapia podría ser ineficaz. Este hecho, además de la nada desdeñable posibilidad de que se den otros mecanismos de resistencia conjuntos, hace por ello necesaria la combinación de varios antibióticos.

Las infecciones causadas por MNPCR también se tratan también con frecuencia con el ciprofloxacino u otras quinolonas. También se han descrito mecanismos de resistencia a estos antibióticos tanto en micobacterias ^{18,132,150}, como en otros géneros bacterianos ^{272,367}. Dentro de éstos, las bombas de eflujo activo son mecanismos de resistencia conocidos en *Bacteria* Gram positivas como Gram negativas ^{45,81,310}. LfrA es la primera bomba de eflujo descrita en micobacterias (concretamente en *M. smegmatis*) y da lugar a resistencia a las fluorquinolonas, incluyendo el ciprofloxacino, así como a otros compuestos ⁴⁵, dando lugar a resistencias de bajo nivel. Así mismo, posee características similares con otras bombas parecidas descritas en otras especies ¹⁹⁶, pudiendo ser inducibles en función de los sustratos ⁴⁵. Esta bomba no ha sido detectada en nuestro estudio, con la excepción de cuatro cepas: dos cepas sensibles al ciprofloxacino y dos resistentes. La presencia del gen fue confirmada por secuenciación, lo que puede indicar que en las cepas

sensibles el gen no se exprese correctamente o se den problemas en el mecanismo regulador por represión ⁴⁵. Sin embargo la baja CMI de las cepas resistentes se adecua a los resultados descritos en relación con el mecanismo de actuación por bombeo del gen estudiado. La resistencia al ciprofloxacino de las escasas ocho cepas negativas para el gen *lfrA* detectadas se deberá a otros mecanismos. La efectividad del levofloxacino fue variable, pero no hay criterios de interpretación que permitan valorar la sensibilidad o resistencia de las cepas estudiadas.

Si tenemos en cuenta la resistencia a las tetraciclinas y antibióticos derivados, un 42,95 % de las cepas estudiadas fueron resistentes a la doxiciclina y un 25,64 % presentaron una resistencia intermedia. La efectividad de la tigeciclina fue buena, pero no hay criterios de interpretación. Las tetraciclinas son muy utilizadas como terapia antibiótica por su actividad frente a numerosas *Bacteria*, lo que ha provocado un claro aumento de las resistencias a la misma. Se ha descrito en la literatura su eficacia frente a *M. fortuitum* y con menos frecuencia frente a *M. chelonae* y *M. abscessus* ^{36,77}. Nuestros datos indican que el 77,77 % de las cepas de *M. abscessus*, el 51,61 % de las cepas de *M. chelonae* y una nada desdeñable 37,80 % de las cepas de *M. fortuitum* estudiadas son resistentes a la doxiciclina según los criterios del CLSI ²²⁵. Las resistencias estudiadas pueden deberse a modificaciones ribosomales o a bombas de eflujo activo ^{30,238,259}. Dentro de estas últimas se ha descrito la bomba Tap como inductora de resistencias de bajo nivel a las tetraciclinas en *M. fortuitum* ⁴. Esta proteína es capaz, como otras bombas de eflujo ^{196,310}, de reconocer

antibióticos como sustratos, siendo homóloga de las bombas de eflujo de macrólidos ⁴. Produce resistencia, además, a los aminoglucósidos ⁴ pudiendo regular otros mecanismos de resistencia ²⁵⁹. Esta proteína transmembrana, altera, además, la permeabilidad produciendo diferentes niveles de resistencia frente a otros antimicrobianos ²⁵⁹. La mayoría de las cepas con fenotipo intermedio dieron positivas en la detección del gen, resultado congruente con el mecanismo de acción de las bombas de eflujo. Gran parte de las cepas resistentes también fueron positivas. Aunque se dieron resistencias de alto nivel, poco propias de una bomba de eflujo, esto se puede deber a la posible variación de la permeabilidad producida por Tap o a la asociación de varios mecanismos de resistencia. Diez cepas sensibles fueron positivas para el gen, lo que puede deberse a problemas a nivel genético o a falta de expresión del gen, dependiente de sustrato. La veracidad del resultado se comprobó por secuenciación.

Las MNPCR fueron consideradas durante años como colonizadoras o no patógenas, aunque actualmente se las considera como patógenos emergentes, asociándose a un aumento significativo del número de pacientes susceptibles de tener una infección causada por estas *Bacteria*. Además de la complejidad que supone su tratamiento, la escasez de información sobre sus mecanismos de resistencia y la gran variabilidad en las enfermedades que pueden causar, incluyendo infecciones en prótesis ortopédicas ¹⁰³, hay otro punto fundamental en la patogenicidad y en la resistencia de las MNPCR: la capacidad de formar biopelículas ^{21,67,106}. Hay muy pocos estudios sobre la patogenicidad de estas

Bacteria, la mayoría de los cuales está realizado con un escaso número de cepas. Se han buscado diversos factores, desde la capacidad de penetración y supervivencia intracelular ^{48,102} a la presencia de enzimas con actividad hemolítica ^{133,322}. Actualmente se tiene en cuenta que la mayor parte de los síndromes producidos por las MNPCR podría estar relacionado con el desarrollo de biopelículas, como ocurre con las infecciones en cuerpo extraño o las infecciones crónicas del tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística ⁶⁶. Esto explicaría también la dificultad de erradicar dichos organismos, con la consiguiente aparición de fallos terapéuticos pese a ser la bacteria sensible *in vitro* al antibiótico.

En relación con la patogenicidad de unas *Bacteria* ambientales, *a priori* poco agresivas ¹⁷⁰, la presencia de un fenotipo rugoso o uno liso en un medio de cultivo convencional con base de agar se ha asociado a posibles mecanismos de patogenicidad a través de cambios en la composición lipídica de la pared bacteriana. Varios estudios realizados en *M. abscessus* ^{48,53,158} exponían que las colonias rugosas son patógenas, mientras que las lisas no lo son en estudios experimentales en modelos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo la principal limitación de estos estudios es el número escaso de cepas analizadas. En uno de estos trabajos, desarrollado con dos cepas de *M. abscessus*, el potencial patogénico se evaluó específicamente para ambas cepas en un modelo experimental de infección en animales ⁴⁸. En otro estudio basado en una sola cepa de *M. abscessus* ¹⁵⁸, se pone de manifiesto la reversión espontánea de un fenotipo a otro, pero manteniendo la misma relación de patogenicidad,

relacionando el fenotipo con la producción de GPLs de la pared celular, que también serían los causantes de la movilidad y de la capacidad para formar biopelículas, según otros estudios previos realizados con *M. smegmatis*^{262,263}. En nuestros estudios no se han podido correlacionar los distintos fenotipos con la patogenicidad¹⁰².

La capacidad del género *Mycobacterium* para desarrollar biopelículas se descubrió en 1980, cuando varios estudios demostraron la presencia de estos organismos en biopelículas obtenidas de muestras ambientales^{112,290,324} y en un modelo experimental²⁸⁹. A pesar de que las micobacterias de crecimiento lento fueron los aislamientos más frecuentes, tanto *M. chelonae* como *M. fortuitum* aparecieron en dichas muestras.

La adherencia de un microorganismo a una superficie es el primer paso en la formación de las biopelículas bacterianas^{237,330} que desempeñan un importante papel al garantizar la supervivencia de las *Bacteria* en la superficie de las mucosas³³⁰ y por tanto, su persistencia en el tracto nasofaríngeo y las vías respiratorias bajas, en tejidos^{265,266}, en biomateriales³⁶⁴, en rocas, en cañerías etc.⁵¹. Los experimentos realizados con *M. avium* han demostrado que estas *Bacteria* son capaces de adherirse a células epiteliales, antes de invadirlas para multiplicarse en su interior²⁸. La interacción inicial de la bacteria con una superficie sólida está condicionada por una multitud de factores referidos tanto a la superficie -como son el material, la carga, la capacidad de adsorción de moléculas orgánicas, la hidrofobicidad y la micro-topografía de la misma-²³⁷, como a la existencia de nutrientes en el medio o la presencia de estructuras

bacterianas con función adhesina ³³⁰. Hay pocos estudios sobre la adherencia a superficies por parte de las micobacterias. En nuestro estudio, todas las cepas consiguieron adherirse a al biomaterial propuesto, sutura de polipropileno, que es un material usado comúnmente en procedimientos quirúrgicos ³⁶⁴. Estos últimos son un factor de riesgo relacionado con la aparición de infecciones nosocomiales causadas por MNPCR ^{37,169,254}. En nuestro caso se incluyeron en el estudio dos cepas de MNPCR causantes de infección en pacientes portadores de una malla monofilamentosa de polipropileno tras una cirugía de hernia, donde fue necesario retirarlas para conseguir la curación del paciente. De la malla se obtuvieron aislamientos de micobacterias, probablemente establecidas en una biopelícula. Como control en nuestros estudios de adherencia se utilizó *S. epidermidis*, productor de glucocálix, por ser el aislamiento más frecuente en infecciones relacionadas con biomateriales ¹⁰³. Las diferencias estadísticamente significativas resultantes indican una mayor capacidad de adherencia de *M. fortuitum* y *M. chelonae*, especies descritas como causantes frecuentes de este tipo de infecciones ³⁶, mientras que *M. peregrinum*, que tiene una baja capacidad adherente, es clínicamente significativo sólo en raras ocasiones. No hay tampoco relación entre la velocidad de crecimiento de las distintas cepas (bastante uniforme en todas ellas) y la adhesión a sutura de polipropileno. Así mismo, otros estudios han demostrado la capacidad de adherirse a superficies de estos microorganismos, tanto en membranas de celulosa diacetato ²⁶⁹, como en catéter ^{6,148}, donde además, se detecto el desarrollo de biopelícula *in vivo*. Parece ser que el

metabolismo de los lípidos está, también, relacionado con la adherencia de las micobacterias ya que su pared celular está compuesta de gran cantidad de moléculas lipídicas que hacen a la bacteria hidrofóbica, siendo la hidrofobicidad un factor importante en la capacidad de adhesión a biomateriales ^{89,175}. Es posible que existan diferencias en la composición de la pared celular que expliquen las diferencias observadas en la adherencia. Además, otras sustancias como el plasma o el suero pueden variar también la capacidad de adherencia. En consecuencia, la capacidad de adherencia a cuerpos extraños podría ser un factor de patogenicidad de las MNPCR, y estaría directamente relacionado con el hecho de que, habitualmente, las especies causantes de infección son *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*, que en nuestro estudio son las que presentan mayor capacidad de adherencia.

Los compuestos lipídicos de la pared celular de las micobacterias también están relacionados con otro factor que parece, a su vez, en consonancia con el desarrollo de biopelículas: la movilidad por deslizamiento. Al igual que con el fenotipo, se ha relacionado este tipo de movilidad con la capacidad de formar biopelículas ^{135,207,263}. En nuestros estudios no se ha podido corroborar este dato, ya que no se pudo establecer una relación estadísticamente significativa. En este sentido, la movilidad fue muy variable entre las especies estudiadas. Parece ser que los cambios en la temperatura de incubación podrían influir tanto en el desarrollo de la biopelícula como en la movilidad. Por ello, en nuestro estudio optamos por la temperatura de 37° C por ser la que estaba previamente descrita ²⁰⁷. Posiblemente el diferente contenido en GLPs de la

pared celular de las MNPCR afecte también al resultado obtenido. Tanto entre las cepas de colección como los aislamientos clínicos, muchas no mostraron movilidad por deslizamiento en las condiciones propuestas, pero fueron capaces de desarrollar biopelícula, también en las condiciones propuestas, con lo que no se pudo establecer la relación en cepas de colección para *M. abscessus*¹³⁸ y *M. smegmatis*^{262,263}. Nuestros resultados coinciden por otra parte con otros estudios que indican que esta relación no es uniforme^{106,124}. Idénticos resultados se obtuvieron al comparar el fenotipo de la colonia y el desarrollo de la biopelícula o la movilidad, con la excepción de *M. peregrinum*, cuyas colonias lisas no presentaron movilidad por deslizamiento. Este resultado contradice estudios previos realizados con un escaso número de cepas, donde se había descrito que las colonias lisas de MNPCR presentaban dicho tipo de movilidad³. En relación también con la presencia de GLPs y otras moléculas lipídicas se encuentra la chaperona GroEL1, implicada en el metabolismo de los lípidos y por tanto en el desarrollo de las biopelículas²²⁷. Prácticamente la totalidad de las cepas estudiadas estaban en posesión del gen *groEL* estudiado; estos datos se verificaron mediante secuenciación. Al ser una proteína de respuesta en situaciones de estrés²²⁷, no es de extrañar este resultado, máxime cuando la única cepa negativa fue una de las cepas de colección de *M. fortuitum*, que, como ya se ha comentado anteriormente, puede haber sufrido pérdida de la carga genética⁵⁹. Como tanto las cepas con capacidad para desarrollar biopelícula como las que carecen de la misma poseen el gen, podemos decir que deben de existir otros mecanismos

relacionados con esta capacidad, además de que una posible variación en la expresión genética de la chaperona influya en la misma. Así mismo hay que tener en cuenta, que si la temperatura puede variar la formación de las biopelículas, otros factores como los nutrientes, el tipo de material, etc., pueden influir en el desarrollo de la biopelícula ¹⁴².

En este sentido, estudiamos la capacidad de desarrollar biopelículas de las cepas de colección en varios medios con diferencias en la cantidad de nutrientes. Otros estudios han demostrado el desarrollo de biopelículas por parte de MNPCR en condiciones de flujo continuo, además del efecto de los nutrientes en dicho desarrollo. Se demostró que se requiere una mayor cantidad de tiempo para el desarrollo de la biopelícula cuando los nutrientes del medio son escasos tanto en *M. fortuitum* como en *M. chelonae* ¹⁴². En nuestro estudio con las cepas de colección, utilizamos agua corriente, PBS suplementado al 5 % con glucosa y Middlebrook 7H9. La biopelícula se desarrolló rápidamente en Middlebrook y más lentamente en agua. Finalmente, en PBS no se lograron los objetivos finales de cobertura del 100 % de la superficie durante el tiempo máximo de incubación definido en el estudio. Las diferencias obtenidas entre el agua y el PBS pueden deberse a que la primera posee en su composición muchas moléculas químicas y nutrientes esenciales en pequeñas cantidades, y que son fundamentales para muchos organismos, incluidas las micobacterias ³²⁴. Independientemente del medio utilizado, en todos los casos el crecimiento se desarrolló en forma de una curva sigmoidea idéntica a la descrita en la literatura ¹⁴³. Todas las cepas de colección fueron

capaces de generar la biopelícula, haciendo que sea un factor posiblemente importante en la patogenia de las MNPCR ¹⁰⁶, al igual que lo es en otras *Bacteria* ¹⁴¹. De entre todas las cepas de colección analizadas, destaca la cepa de *M. abscessus*, que fue la más rápida. Como esta especie es la MNPCR más patógena ³⁶, dicha diferencia podría representar la propiedad que hace que lo sea con respecto a las demás MNPCR. Además ha sido ampliamente descrita como causante de infecciones relacionadas con biopelículas ¹⁴⁶. Existe, por otra parte la posibilidad de que otros mecanismos de patogenicidad estén también relacionados con las biopelículas. Se utilizó la temperatura ambiental para el experimento por ser la temperatura en la que, en condiciones naturales, las micobacterias forman las biopelículas, al igual que la temperatura del experimento de adherencia se seleccionó en función de lo descrito anteriormente ³⁶⁴.

En nuestro estudio, en los casos diagnosticados en la Fundación Jiménez Díaz, aproximadamente la mitad de las infecciones causadas con MNPCR tiene que ver con la formación de biopelículas ¹⁰⁰. Por tanto es interesante el estudio de las biopelículas de los aislamientos clínicos, sobre todo de aquellos que son clínicamente significativos y que se han aislado de infecciones con causa relacionada con la presencia de biopelículas. En este sentido, no hay estudios en la literatura que evalúen esta capacidad en aislamientos clínicos. Se pretende en nuestro caso buscar la relación entre la capacidad de formar biopelículas con la capacidad de producir infección, para así poder establecer la biopelícula como factor de patogenicidad en las MNPCR. Para ello se

utilizaron las condiciones óptimas del experimento anterior, realizado con cepas de colección.

En este nuevo experimento se pudo establecer una relación estadísticamente significativa entre la capacidad de formación de biopelículas y el significado clínico, permitiendo confirmar que la biopelícula es un mecanismo de patogenicidad importante de las MNPCR. Sin embargo, todas las cepas de *M. mageritense* desarrollaron biopelículas pero ninguna era causante de infección clara en humanos, pero éste no es un resultado concluyente dada la escasa cantidad de cepas analizadas.

Finalmente, la mayor importancia de la presencia de biopelículas en infecciones radica en que es un factor fundamental en la resistencia a los antibióticos que confiere a las *Bacteria* embebidas en su matriz y que puede provocar fracasos terapéuticos ⁵⁸. Además, confiere resistencia a desinfectantes y germicidas ¹⁴¹. Para ejercer su acción, el antibiótico tiene que ser capaz de penetrar en la biopelícula, lo que depende de la estructura de la misma así como de las características bioquímicas de la matriz que se establece alrededor envolviendo a las *Bacteria*, existiendo diferencias en la capacidad de penetración de los antibióticos ²⁴ en la biopelícula. El efecto de los antisépticos sobre las biopelículas de MNPCR fue estudiado por Vess *et al.* ³²⁸ en *M. chelonae* y *M. abscessus*, que sobrevivieron a 10-15 ppm de cloro libre. Otro estudio evaluó la resistencia de biopelículas de *M. avium*, mostrando una mayor resistencia a la claritromicina y la rifampicina, debida probablemente a problemas de permeabilidad ¹¹¹. En el caso de *M. tuberculosis*, estudios

recientes demuestran que la biopelícula que forman es resistente a la isoniazida y a la rifampicina, por cambios metabólicos ²²⁸. Además hay un estudio sobre el efecto de la isoniazida sobre la biopelícula de *M. smegmatis*, que podría deberse a problemas de permeabilidad además de a otros factores desconocidos ³¹⁵.

El sistema desarrollado por Calgary ²¹, permite estudiar el efecto de sustancias antimicrobianas en una biopelícula utilizando un sistema normalizado, incluidas las MNPCR ²¹, pudiéndose comparar los resultados. Este sistema ha permitido estudiar el efecto de desinfectantes sobre biopelículas de *M. fortuitum* y *M. marinum*, demostrando que las *Bacteria* de la biopelícula poseen una mayor resistencia a biocidas que las sésiles ²¹.

Otro estudio reciente muestra que la biopelícula de *M. abscessus* es resistente a la cefoxitina, la amicacina y la claritromicina ¹³⁸, siendo la amicacina más activa que la claritromicina. Se proponen como causas de esa resistencia, las limitaciones de nutrientes y el metabolismo latente de algunas *Bacteria* de la biopelícula.

En nuestro estudio, la amicacina muestra mejor penetración que la claritromicina, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. De los mecanismos propuestos para explicar la resistencia de las biopelículas (impermeabilidad, cambios metabólicos o activación de genes de resistencia), no hay uno claro en el caso de las MNPCR. En este estudio se han evidenciado mínimas diferencias en la permeabilidad entre las diferentes especies y los antibióticos (*M. abscessus* con la amicacina y el ciprofloxacino y

M. peregrinum con la claritromicina). Sin embargo, sí que hay importantes diferencias en las curvas de penetración de las especies, diferentes a los obtenidos en otros estudios, donde el ciprofloxacino penetra mejor que otros antibióticos en las biopelículas de *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* o *Pseudomonas aeruginosa*³⁵⁹. En el trabajo de Walters *et al.*³³⁵, la penetración de ciprofloxacino en la biopelícula de *P. aeruginosa* es mucho mayor que la de la tobramicina. En nuestro estudio, la penetración del ciprofloxacino es mucho menor que la de la amicacina. Esto puede deberse a diferencias en la composición de la matriz extracelular, que es polisacárida en *P. aeruginosa*³⁵⁹ y probablemente lipídica en MNPCR^{158,228,262}.

No se detectaron diferencias en la permeabilidad en función de si la cepa analizada era clínica o de colección, y tampoco se detectaron diferencias en relación con la susceptibilidad antibiótica de las cepas estudiadas. La permeabilidad no está por ello relacionada con el origen o la resistencia *in vitro* de las cepas.



CONCLUSIONES



J. Las MNPCR presentan importantes diferencias en la capacidad de producir infección en humanos, siendo especialmente patógena la especie *M. abscessus*, seguida por *M. chelonae* y *M. fortuitum*.

JJ. No existe relación entre los distintos aislamientos de una misma especie, independientemente de su origen, por lo que puede descartarse la transmisión entre humanos de estos organismos.

JJJ. Los resultados del estudio de sensibilidad por microdilución en caldo evidencian la existencia de diferencias individuales en la sensibilidad de las cepas estudiadas frente a los distintos antibióticos estudiados, siendo la tigeciclina un nuevo antibiótico con buena actividad frente a todas las cepas evaluadas.

JV. Los genes *erm* están presentes en todas las especies de MNPCR analizadas, aunque su presencia no se correlaciona necesariamente con la aparición de resistencia fenotípica, por lo que sería necesario asociar otros antibióticos en el tratamiento para soslayar la posible resistencia causada por estos genes.

V. Las bombas de eflujo dependientes de energía son mecanismos de resistencia detectados en las MNPCR. A pesar de su presencia, deben existir otros mecanismos que completen los resultados obtenidos.

VJ. Todas las cepas de MNPCR fueron capaces de adherirse al polipropileno, aunque existen diferencias entre especies que permitirían

deducir que esta habilidad puede estar relacionada con la capacidad de causar infecciones en humanos.

VII. Todas las cepas de colección fueron capaces de desarrollar biopelículas *in vitro* en las condiciones propuestas en el experimento. La composición del medio influye en la velocidad de desarrollo de biopelículas u otros mecanismos relacionados.

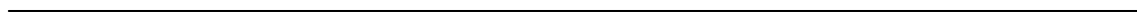
VIII. La capacidad para desarrollar biopelículas no es uniforme entre los aislamientos clínicos de MNPCR, y está relacionada con la capacidad de producir infección en humanos.

IX. El fenotipo de la colonia, la movilidad y la capacidad de formar biopelícula no están uniformemente relacionadas entre sí ni con la significación clínica.

X. El gen *groEL* está presente en todos los aislamientos clínicos, con lo que su mera presencia no determina la capacidad de formar biopelículas por parte de las MNPCR.

XI. Se han detectado importantes diferencias en la penetración de los antibióticos en las biopelículas de MNPCR, existiendo una importante impermeabilidad al ciprofloxacino. Éste podría ser un mecanismo de resistencia importante en las infecciones en que estén implicadas las biopelículas de MNPCR.





BIBLIOGRAFÍA

-
1. Nontuberculous mycobacterial infections after cosmetic surgery--Santo Domingo, Dominican Republic, 2003-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **53**, 509 (2004).
 2. Adekambi, T. *et al.* Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. *J Clin Microbiol* **44**, 1268-73 (2006).
 3. Agustí, G. *et al.* Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies. *J Bacteriol* **190**, 6894-6902. (2008).
 4. Ainsa, J.A. *et al.* Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **180**, 5836-5843 (1998).
 5. Al Shaalan, M. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* interstitial pneumonia with vasculitis in a child with Wilms' tumor. *Pediatr Infect Dis J* **16**, 996-1000 (1997).
 6. Ali, S., Khan, F.A. & Fisher, M. Catheter-related bloodstream infection caused by *Mycobacterium mageritense*. *J Clin Microbiol* **45**, 273 (2007).
 7. Alvarez-Elcoro, S., Mateos-Mora, M. & Zajarias, A. *Mycobacterium fortuitum* endocarditis after mitral valve replacement with a bovine prosthesis. *South Med J* **78**, 865-6 (1985).
 8. Anderl, J.N., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1818-1824 (2000).
 9. Andini, N. & Nash, K.A. Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2560-2562 (2006).
 10. Anonymous. Group 21-The Mycobacteria. in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (eds. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T.) 597-603 (Williams & Wilkins, Baltimore, 1994).
 11. Anonymous. Case 33-1996. *N Eng J Med* **335**, 1303-1307 (1996).
 12. Appelgren, P. *et al.* Late-onset posttraumatic skin and soft-tissue infections caused by rapid-growing mycobacteria in tsunami survivors. *Clin Infect Dis* **47**, e11-6 (2008).
 13. Arora, K. *et al.* Inactivation of *Isr2* results in a hypermotile phenotype in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **190**, 4291-300 (2008).
 14. Artenstein, A.W., Eiseman, A.S. & Campbell, G.C. Chronic dacryocystitis caused by *Mycobacterium fortuitum*. *Ophthalmology* **100**, 666-8 (1993).
 15. Ausina, V. *et al.* *Mycobacterium alvei* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 529-35 (1992).
 16. Avery, R.K. *et al.* Bilateral otitis media and mastoiditis caused by a highly resistant strain of *Mycobacterium chelonae*. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 1037-40 (1996).
 17. Azadian, B.S. *et al.* Disseminated infection with *Mycobacterium chelonae* in a haemodialysis patient. *Tubercle* **62**, 281-4 (1981).
 18. Bagchi, M.C., Mills, D. & Basak, S.C. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies of quinolone antibacterials against *M. fortuitum* and *M. smegmatis* using theoretical molecular descriptors. *J Mol Model* **13**, 111-20 (2007).
 19. Baldi, S. *et al.* Atypical mycobacteriosis in a lung transplant recipient. *Eur Respir J* **10**, 952-4 (1997).
 20. Banerjee, S.K. *et al.* Involvement of a natural transport system in the

-
- process of efflux-mediated drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Gen Genet* **262**, 949-56 (2000).
21. Bardouniotis, E., Ceri, H. & Olson, M.E. Biofilm formation and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. *Curr Microbiol* **46**, 28-32 (2003).
 22. Bardouniotis, E. *et al.* Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC™ assay system. *FEMS Microbiol Lett* **203**, 263-267 (2001).
 23. Barksdale, L. & Kim, K.S. *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev* **41**, 217-312 (1977).
 24. Bdi-Ali, A., Mohammadi-Mehr, M. & Agha, A.Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm -producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **27**, 196-200 (2006).
 25. Ben-Chaim, J. *et al.* Persistent vasocutaneous fistula associated with chronic urinary *Mycobacterium chelonae* infection. *J Urol* **149**, 140-1 (1993).
 26. Bengualid, V. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* and anaerobic breast abscess following nipple piercing: case presentation and review of the literature. *J Adolesc Health* **42**, 530-2 (2008).
 27. Berisio, R. *et al.* 23S rRNA 2058A-->G alteration mediates ketolide resistance in combination with deletion in L22. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3816-23 (2006).
 28. Bermudez, L.E., Shelton, K. & Young, L.S. Comparison of the ability of *Mycobacterium avium*, *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* to invade and replicate within HEP-2 epithelial cells. *Tuber Lung Dis* **76**, 240-7 (1995).
 29. Biehle, J.R. *et al.* Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **33**, 1760-4 (1995).
 30. Blokpoel, M.C. *et al.* Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Res* **33**, e22 (2005).
 31. Bolan, G. *et al.* Infections with *Mycobacterium chelonae* in patients receiving dialysis and using processed hemodialyzers. *J Infect Dis* **152**, 1013-9 (1985).
 32. Bolmström, A. *et al.* Validation and reproducibility assessment of tigecycline MIC determinations by Etest. *J Clin Microbiol* **45**, 2474-9 (2007).
 33. Booth, J.E. *et al.* Infection of prosthetic arthroplasty by *Mycobacterium fortuitum*. Two case reports. *J Bone Joint Surg [Am]* **61**, 300-2 (1979).
 34. Boucher, H.W., Wennersten, C.B. & Eliopoulos, G.M. In Vitro Activities of the Glycylcycline GAR-936 against Gram-Positive Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2225-2229 (2000).
 35. Brancato, R. *et al.* *Mycobacterium chelonae* keratitis after excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* **115**, 1316-8 (1997).
 36. Brown-Elliott, B.A. & Wallace, R.J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **15**, 716-746. (2002).
 37. Brown, A., Grubbs, P. & Mongey, A.B. Infection of total hip prosthesis by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium chelonae* in a patient with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* **27**, 543-5 (2008).
 38. Brown, B.A. *et al.* *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**, 1493-511 (1999).
 39. Brown, B.A. & Wallace, R.J. Infections due to nontuberculous mycobacteria. in *Principles and practice of infectious diseases* (eds. Mandell, G.L.,

-
- Bennett, J.E. & Dolin, R.) 2630-2636 (Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000).
40. Brown, B.A., Wallace, R.J., Jr. & Onyi, G. Activities of the glycolcyclines N,N-dimethylglycylamido-minocycline and N,N-dimethylglycylamido-6-demethyl-6-deoxytetracycline against *Nocardia* spp. and tetracycline-resistant isolates of rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 874-8 (1996).
 41. Brown, B.A. *et al.* Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *M. chelonae*-like organisms. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 180-4 (1992).
 42. Brunello, F. *et al.* Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol* **39**, 2799-806 (2001).
 43. Burns, D.N. *et al.* Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am Rev Respir Dis* **144**, 1153-9 (1991).
 44. Burns, J.L. *et al.* Unusual presentations of nontuberculous mycobacterial infections in children. *Pediatr Infect Dis J* **16**, 802-806 (1997).
 45. Buroni, S. *et al.* LfrR Is a Repressor That Regulates Expression of the Efflux Pump LfrA in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 4044-52 (2006).
 46. Butt, A.A. Cervical adenitis due to *Mycobacterium fortuitum* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med Sci* **315**, 50-5 (1998).
 47. Butt, A.A. & Janney, A. Arthritis due to mycobacterium fortuitum. *Scand J Infect Dis* **30**, 525-7 (1998).
 48. Byrd, T.F. & Lyons, C.R. Preliminary characterization of *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* **67**, 4700-4707 (1999).
 49. Camargo, D. *et al.* Iatrogenic outbreak of *M. chelonae* skin abscesses. *Epidemiol Infect* **117**, 113-9 (1996).
 50. Carpenter, J.L., Troxell, M. & Wallace, R.J., Jr. Disseminated disease due to *Mycobacterium chelonae* treated with amikacin and cefoxitin. Absence of killing with either agent and possible role of granulocytes in clinical response. *Arch Intern Med* **144**, 2063-5 (1984).
 51. Carpentier, B. & Cerf, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* **75**, 499-511. (1993).
 52. Carson, L.A. *et al.* Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. *Appl Environ Microbiol* **54**, 3122-3125 (1988).
 53. Catherinot, E. *et al.* Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun* **75**, 1055-8 (2007).
 54. Clegg, H.W. *et al.* Mammoplasty-associated mycobacterial infection: a survey of plastic surgeons. *Plast Reconstr Surg* **72**, 165-9 (1983).
 55. Clegg, H.W. *et al.* Infection due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex after augmentation mammoplasty: Clinical and epidemiological features. *J Infect Dis* **147**, 427-433 (1983).
 56. Colin, A.A. Eradication of *Mycobacterium abscessus* in a chronically infected patient with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **30**, 267-8 (2000).
 57. Cooksey, R.C. *et al.* *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int*

-
- J Syst Evol Microbiol* **54**, 2385-91 (2004).
58. Costerton, J.W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin. Orthop.* **437**, 7-11. (2005).
 59. Costerton, J.W. *The biofilm primer*, (Springer-Verlag, Berlin, 2007).
 60. Covert, T.C. *et al.* Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2492-6 (1999).
 61. Cullen, A.R. *et al.* *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 641-5 (2000).
 62. Cutay, A.M. *et al.* Infection of epicardial pacemaker wires due to *Mycobacterium abscessus*. *Clin Infect Dis* **26**, 520-1 (1998).
 63. Chan, K.H., Mann, K.S. & Seto, W.H. Infection of a shunt by *Mycobacterium fortuitum*: case report. *Neurosurgery* **29**, 472-4 (1991).
 64. Chang, J.T. *et al.* *Mycobacterium abscessus* cervical lymphadenitis: an immunocompetent child. *Kaohsiung J Med Sci* **22**, 415-9 (2006).
 65. Chawla, P.G. & Nevins, T.E. Management of hemodialysis catheter-related bacteremia--a 10-year experience. *Pediatr Nephrol* **14**, 198-202 (2000).
 66. Chbeir, E. *et al.* Adult cystic fibrosis presenting with recurrent nontuberculous mycobacterial infections. *Lancet* **367**, 1952 (2006).
 67. Chen, J.M. *et al.* Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **188**, 633-41 (2006).
 68. Chetchotisakd, P. *et al.* Disseminated nontuberculous mycobacterial infection in patients who are not infected with HIV in Thailand. *Clin Infect Dis* **45**, 421-7 (2007).
 69. Chetchotisakd, P. *et al.* Disseminated infection due to rapidly growing mycobacteria in immunocompetent hosts presenting with chronic lymphadenopathy: a previously unrecognized clinical entity. *Clin Infect Dis* **30**, 29-34 (2000).
 70. Cheung, I. & Wilson, A. *Mycobacterium fortuitum* infection following total knee arthroplasty: A case report and literature review. *Knee* **15**, 61-3 (2008).
 71. Choueiry, M.A. *et al.* Disseminated infection due to *Mycobacterium fortuitum* in a patient with desmoid tumor. *Clin Infect Dis* **26**, 237-8 (1998).
 72. Chung, M.S. *et al.* *Mycobacterium chelonae* keratitis after laser in situ keratomileusis successfully treated with medical therapy and flap removal. *Am J Ophthalmol* **129**, 382-4 (2000).
 73. Chung, S.H. *et al.* *Mycobacterium abscessus* keratitis after LASIK with IntraLase femtosecond laser. *Ophthalmologica* **220**, 277-80 (2006).
 74. Da Costa Cruz, J. *Mycobacterium fortuitum*: New acid fast bacillus pathogenic for man. *Acta Medica de Rio de Janeiro* **1**, 297 (1938).
 75. da Silva Rocha, A. *et al.* Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J Microbiol Methods* **37**, 223-9 (1999).
 76. da Silva Rocha, A. *et al.* Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of hsp65. *J Clin Microbiol* **40**, 4191-6 (2002).
 77. De Groote, M.A. & Huitt, G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* **42**, 1756-63 (2006).
 78. de Kievit, T.R. *et al.* Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1761-1770 (2001).
 79. de la Cruz, J., Behlau, I. & Pineda, R. Atypical mycobacteria keratitis after laser in situ keratomileusis unresponsive to fourth-generation fluoroquinolone therapy. *J Cataract Refract Surg* **33**, 1318-21 (2007).

-
80. De Rossi, E. *et al.* Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1931-7 (1998).
 81. Dean, C.R. *et al.* Efflux-Mediated Resistance to Tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemoter* **47**, 972-978 (2003).
 82. Devallois, A., Goh, K.S. & Rastogi, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* **35**, 2969-73 (1997).
 83. Diaz, F. *et al.* *Mycobacterium chelonae* infection associated with adalimumab therapy. *Scand J Rheumatol* **37**, 159-60 (2008).
 84. Ding, L.W. *et al.* Disease caused by non-tuberculous mycobacteria in a university hospital in Taiwan, 1997-2003. *Epidemiol Infect* **134**, 1060-7 (2006).
 85. Ding, L.W. *et al.* Lymphadenitis caused by non-tuberculous mycobacteria in a university hospital in Taiwan: predominance of rapidly growing mycobacteria and high recurrence rate. *J Formos Med Assoc* **104**, 897-904 (2005).
 86. Domenech, P. *et al.* *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 535-40 (1997).
 87. Donlan, R.M. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* **7**, 277-279 (2001).
 88. Donlan, R.M. & Costerton, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193 (2002).
 89. Dunne, W.M. Bacteria adherence: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* **15**, 155-166 (2002).
 90. Ebert, D.L. & Olivier, K.N. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Infect Dis Clin North Am* **16**, 221-33 (2002).
 91. Ebert, D.L. & Olivier, K.N. Nontuberculous mycobacteria in the setting of cystic fibrosis. *Clin Chest Med* **23**, 655-63 (2002).
 92. El_Asrar, A.M. & Tabbara, K.F. Chronic endophthalmitis after extracapsular cataract extraction caused by *Mycobacterium chelonae* subspecies *abscessus*. *Eye* **9 (Pt 6)**, 798-801 (1995).
 93. Ellner, P.D. *et al.* Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* **26**, 1349-52 (1988).
 94. Engelhardt, H., Heinz, C. & Niederweis, M. A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **277**, 37567-72 (2002).
 95. Ersoz, G. *et al.* Urinary *Mycobacterium fortuitum* infection in an HIV-infected patient. *Aids* **14**, 2802-3 (2000).
 96. Escalonilla, P. *et al.* Cutaneous manifestations of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Exp Dermatol* **23**, 214-21 (1998).
 97. Escobedo, J.A. *et al.* Infección cutánea por *Mycobacterium chelonae* tras autoinyección de insulina con pluma. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **12**, 274-275 (1994).
 98. Esteban, J. *et al.* Characterization of rapidly growing mycobacteria using a commercial identification system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 73-5 (2000).
 99. Esteban, J., Fernandez-Roblas, R. & Soriano, F. Micobacterias de crecimiento rápido en patología humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **18**,

-
- 279-286 (2000).
100. Esteban, J. *et al.* Clinical significance and epidemiology of non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a university hospital. *J Infect* **54**, 135-45 (2007).
 101. Esteban, J. *et al.* A comparison between disk diffusion and microdilution for susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* complex. *J Chemother (Florence, Italy)* **14**, 547-53 (2002).
 102. Esteban, J. *et al.* Evaluación de la capacidad invasiva de las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido mediante el estudio de la morfología de las microcolonias en fibroblastos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **24**, 551-555 (2006).
 103. Esteban, J. *et al.* Evaluation Of Quantitative Cultures From Sonicated Retrieved Orthopaedic Implants In The Diagnosis Of Orthopaedic Infection. . *J Clin Microbiol* **46**, 488-492. (2008).
 104. Esteban, J. *et al.* Significado clínico de los aislamientos de micobacterias de crecimiento rápido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **15**, 260-3 (1997).
 105. Esteban, J. *et al.* Epidemiology of infections due to nonpigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2008).
 106. Esteban, J. *et al.* Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol* **8**(2008).
 107. Esteban, J., Zamora, N. & Ortiz, A. Use of molecular techniques for epidemiological typing of rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* **12**, 943-4; author reply 944 (2006).
 108. Esteban, J. *et al.* Recent developments in the study of pathogenesis of infections due to non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Current Trends in Microbiology* **2** (2006).
 109. Etienne, G. *et al.* The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **148**, 3089-100 (2002).
 110. Euzéby, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: *Mycobacterium*. Vol. 2003. Fecha de acceso: 30-march-2006 (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>, 2006).
 111. Falkinham, J.O., 3rd. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol* **56**, 250-4 (2007).
 112. Falkinham, J.O., 3rd, Norton, C.D. & LeChevallier, M.W. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1225-31 (2001).
 113. Ferguson, P.J. & Saulsbury, F.T. Successful treatment of chronic *Mycobacterium abscessus* otitis media with clarithromycin. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 384-5 (1996).
 114. Fernandez Roblas, R. *et al.* In vitro susceptibilities of rapidly growing mycobacteria to telithromycin (HMR 3647) and seven other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 181-2 (2000).
 115. Fernández Roblas, R. *et al.* In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. (2008).
 116. Ferringer, T., Pride, H. & Tyler, W. Body piercing complicated by atypical mycobacterial infections. *Pediatr Dermatol* **25**, 219-22 (2008).
 117. Fisk, P. An inguinal bubo caused by *Mycobacterium chelonae abscessus*. *Int J STD AIDS* **3**, 447 (1992).

-
118. Flint, D. *et al.* Nontuberculous mycobacterial otomastoiditis in children: four cases and a literature review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **51**, 121-7 (1999).
 119. Flor, A. *et al.* Nontuberculous mycobacterial meningitis: report of two cases and review. *Clin Infect Dis* **23**, 1266-73 (1996).
 120. Flores, A.R., Parsons, L.M. & Pavelka, M.S., Jr. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology* **151**, 521-32 (2005).
 121. Ford, J.G. *et al.* Nontuberculous mycobacterial keratitis in south Florida. *Ophthalmology* **105**, 1652-8 (1998).
 122. Forslund, T. *et al.* Disseminated cutaneous infection due to *Mycobacterium chelonae* in a patient with rheumatoid arthritis, amyloidosis, and renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **10**, 1234-6 (1995).
 123. Fox, L.E. *et al.* Disseminated subcutaneous *Mycobacterium fortuitum* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* **206**, 53-5 (1995).
 124. Freeman, R. *et al.* Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* (2006).
 125. Fux, C.A. *et al.* Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 34-40 (2005).
 126. Galil, K. *et al.* Abscesses due to mycobacterium abscessus linked to injection of unapproved alternative medication. *Emerg Infect Dis* **5**, 681-7 (1999).
 127. Garcia-de-Viedma, D. *et al.* Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unitvariable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol* **43**, 5660-5664 (2005).
 128. Gavia, J.M. *et al.* Nontuberculous mycobacterial infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: characteristics of respiratory and catheter-related infections. *Biol Blood Marrow Transplant* **6**, 361-9 (2000).
 129. Gebo, K.A. *et al.* Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* on a Human Immunodeficiency Virus Ward: transient respiratory tract colonization from a contaminated ice machine. *Clin Infect Dis* **35**, 32-8 (2002).
 130. Gelender, H. *et al.* *Mycobacterium* keratitis after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* **16**, 191-5 (2000).
 131. Ghannoum, M. & O'Toole, G.A. *Microbial biofilms*, 426 (ASM Press, Washington, D.C., 2004).
 132. Gillespie, S.H. *et al.* Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J Antimicrob Chemother* **56**, 344-8 (2005).
 133. Gomez, A. *et al.* Detection of phospholipase C in nontuberculous mycobacteria and its possible role in hemolytic activity. *J Clin Microbiol* **39**, 1396-401 (2001).
 134. Goodhart, G.L. *Mycobacterium fortuitum* osteomyelitis following trauma. *J Orthop Trauma* **7**, 142-5 (1993).
 135. Gopalaswamy, R. *et al.* *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation and sliding motility are affected by the serine/threonine protein kinase PknF. *FEMS Microbiol Lett* **278**, 121-7 (2008).
 136. Graham, J.C. *et al.* Non-tuberculous mycobacterial infection in children with cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**, 394-7 (1998).
 137. Grange, J.M. Mycobacterial infections following heart valve replacement. *J Heart Valve Dis* **1**, 102-9 (1992).

-
138. Greendyke, R. & Byrd, T.F. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to planktonic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2019-2026 (2008).
 139. Griffith, D.E., Girard, W.M. & Wallace, R.J., Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* **147**, 1271-8 (1993).
 140. Hadjiliadis, D., Adlakha, A. & Prakash, U.B. Rapidly growing mycobacterial lung infection in association with esophageal disorders. *Mayo Clin Proc* **74**, 45-51 (1999).
 141. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev.* **2**, 95-108. (2004).
 142. Hall-Stoodley, L., Keevil, C.W. & Lappin-Scott, H. *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* biofilm formation under high and low nutrient conditions. *J Appl Microbiol* **65**, 60S-69S (1999).
 143. Hall-Stoodley, L. & Lappin-Scott, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiol Lett* **168**, 77-84 (1998).
 144. Han, X.Y. Seasonality of clinical isolation of rapidly growing mycobacteria. *Epidemiol Infect* **136**, 1188-91 (2008).
 145. Han, X.Y., De, I. & Jacobson, K.L. Rapidly growing mycobacteria: clinical and microbiologic studies of 115 cases. *Am J Clin Pathol* **128**, 612-21 (2007).
 146. Hansen, T.P. & Sarma, D.P. Multiple subcutaneous nodules associate with *Mycobacterium abscessus* infection following removal of an infected Groshon vascular catheter tip. *Dermatol Online J* **12**, 12 (2006).
 147. Hasegawa, T. *et al.* Postoperative osteomyelitis due to *Mycobacterium fortuitum*. A case report. *Arch Orthop Trauma Surg* **111**, 178-80 (1992).
 148. Hawkins, C. *et al.* Catheter-related bloodstream infections caused by rapidly growing nontuberculous mycobacteria: a case series including rare species. *Diagn Microbiol Infect Dis* **61**, 187-91 (2008).
 149. Hector, J.S. *et al.* Large restriction fragment patterns of genomic *Mycobacterium fortuitum* DNA as strain-specific markers and their use in epidemiologic investigation of four nosocomial outbreaks. *J Clin Microbiol* **30**, 1250-5 (1992).
 150. Hegde, S.S. *et al.* A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* **308**, 1480-3 (2005).
 151. Heistein, J.B. *et al.* A prosthetic breast implant infected with *Mycobacterium fortuitum*. *Ann Plast Surg* **44**, 330-3 (2000).
 152. Hernandez, A.M. *et al.* Determination of the in vitro susceptibility of 220 *Mycobacterium fortuitum* isolates to ten antimicrobial agents. *J Chemother* **7**, 503-8 (1995).
 153. Hernandez, S.M. *et al.* Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol* **37**, 3688-92 (1999).
 154. Herold, R.C., Lotke, P.A. & MacGregor, R.R. Prosthetic joint infections secondary to rapidly growing *Mycobacterium fortuitum*. *Clin Orthop*, 183-6 (1987).
 155. Hoffner, S.E. *et al.* Evaluation of Etest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium chelonae* and *M. fortuitum*. *J Clin Microbiol* **32**, 1846-9 (1994).
 156. Horchman, I. *et al.* A case of prolonged urinary tract infection caused by *Mycobacterium fortuitum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**, 725-727 (1992).

-
157. Howard, S.T. & Byrd, T.F. The rapidly growing mycobacterias: saprophytes and parasites. *Microb Infect* **2**, 1845-1853 (2000).
 158. Howard, S.T. *et al.* Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**, 1581-90 (2006).
 159. Hsiao, G.H. & Chiu, H.C. Atypical mycobacterial cervical lymphadenitis associated with Sweet's syndrome. *Acta Derm Venereol* **75**, 237-9 (1995).
 160. Hsueh, P.R. *et al.* Recurrent catheter-related infection caused by a single clone of *Mycobacterium chelonae* with two colonial morphotypes. *J Clin Microbiol* **36**, 1422-4 (1998).
 161. Hu, F.R. Extensive lamellar keratectomy for treatment of nontuberculous mycobacterial keratitis. *Am J Ophthalmol* **120**, 47-54 (1995).
 162. Hu, F.R. & Luh, K.T. Topical ciprofloxacin for treating nontuberculous mycobacterial keratitis. *Ophthalmology* **105**, 269-72 (1998).
 163. Huang, S.C. *et al.* Non-tuberculous mycobacterial keratitis: a study of 22 cases. *Br J Ophthalmol* **80**, 962-8 (1996).
 164. Ingram, C.W. *et al.* Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* **16**, 463-71 (1993).
 165. Ip, F.K. & Chow, S.P. *Mycobacterium fortuitum* infections of the hand. Report of five cases. *J Hand Surg [Br]* **17**, 675-7 (1992).
 166. Irwin, P.J. *et al.* Acute bronchopneumonia associated with *Mycobacterium fortuitum* infection in a dog. *Aust Vet J* **78**, 254-7 (2000).
 167. Isenberg, H.D. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992).
 168. Jacobson, K. *et al.* Clinical and radiological features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria in cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**, 615-21 (1998).
 169. Jain, V. *et al.* Sutureless wound infection by unusual acid-fast organisms. *Cornea* **27**, 615-8 (2008).
 170. Jarzembowski, J.A. & Young, M.B. Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **132**, 1333-1341 (2008).
 171. Jimenez, M.S. *et al.* *Mycobacterium canariasense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1729-34 (2004).
 172. Jonsson, B.E. *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **45**, 1497-504 (2007).
 173. Kanlikama, M. *et al.* Mycobacterial species causing cervicofacial infection in Turkey. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **250**, 237-9 (1993).
 174. Kasamatsu, Y. *et al.* Peritonitis due to *Mycobacterium fortuitum* infection following gastric cancer surgery. *Intern Med* **38**, 833-6 (1999).
 175. Katsikogianni, M. & Missirlis, F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mat* **8**, 37-57 (2004).
 176. Kauppinen, J. *et al.* Hospital water supply as a source of disseminated *Mycobacterium fortuitum* infection in a leukemia patient. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**, 343-5 (1999).
 177. Khermosh, O. *et al.* *Mycobacterium abscessus* (*M. chelonae*) infection of the knee joint: report of two cases following intra-articular injection of corticosteroids. *Clin Orthop Relat Res*, 162-8 (1979).
 178. Kim, B.J. *et al.* Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* **39**, 2102-9 (2001).

-
179. Kocincova, D. *et al.* Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberculosis (Edinb)* (2008).
 180. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberkulose. . *Berliner Klinische Wochenschrift* **15**, 221-230 (1882).
 181. Koontz, F.P. *et al.* Etest for routine clinical antimicrobial susceptibility testing of rapid-growing mycobacteria isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **19**, 183-6 (1994).
 182. Koscielniak, E. *et al.* Disseminated *Mycobacterium peregrinum* infection in a child with complete interferon-gamma receptor-1 deficiency. *Pediatr Infect Dis J* **22**, 378-80 (2003).
 183. Kullavanijaya, P. *et al.* Disseminated *Mycobacterium chelonae* cutaneous infection: recalcitrant to combined antibiotic therapy. *J Dermatol* **30**, 485-91 (2003).
 184. Kuruvila, M.T. *et al.* Mycobacterium fortuitum endocarditis and meningitis after balloon mitral valvotomy. *J Assoc Physicians India* **47**, 1022-3 (1999).
 185. Kusunoki, S. & Ezaki, T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica *et al.*) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 240-5 (1992).
 186. Kuwabara, K. *et al.* Relations between clinical subtypes of *Mycobacterium avium* pulmonary disease and polyclonal infections detected by IS1245 based restriction fragment length polymorphism analysis. *Kekkaku* **79**, 39-46 (2004).
 187. Labombardi, V.J., O'Brien A, M. & Kislak, J.W. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* due to contaminated ice machines. *Am J Infect Control* **30**, 184-6 (2002).
 188. Lai, K.K. *et al.* Long-term laboratory contamination by *Mycobacterium abscessus* resulting in two pseudo-outbreaks: Recognition with use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polymerase Chain Reaction. *Clin Infect Dis* **27**, 169-175 (1998).
 189. Lasa, I. *et al.* Biofilms bacterianos e infección. . *An. Sist. Sanit. Navar* **28**, 163-175. (2005).
 190. Laskowski, L.F. *et al.* Fastidious mycobacteria grown from porcine prosthetic-heart-valve cultures. *N Eng J Med* **297**(1977).
 191. Le Dantec, C. *et al.* Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1025-32 (2002).
 192. Legrand, E. *et al.* A pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium fortuitum* in a Caribbean setting underlines high genetic diversity of the strains and excludes nosocomial outbreaks. *Int J Med Microbiol* **292**, 51-7 (2002).
 193. Lehmann, K.B. & Neumann, R. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik*, (Munich, 1896).
 194. Li, X.Z., Zhang, L. & Nikaido, H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2415-23 (2004).
 195. Lienen, D.A. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* **117**, S131-3 (1997).
 196. Liu, J., Takiff, H.E. & Nikaido, H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **178**, 3791-5 (1996).
 197. Lois, N. & Perez del Molino, M.L. *Mycobacterium chelonae* keratitis:

-
- resolution after debridement and presoaked collagen shields. *Cornea* **14**, 536-9 (1995).
198. Lu, T. *et al.* Effect of chloramphenicol, erythromycin, moxifloxacin, penicillin and tetracycline concentration on the recovery of resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **52**, 61-4 (2003).
 199. Madaras-Kelly, K.J., DeMasters, T.A. & Stevens, D.L. *Mycobacterium fortuitum* meningitis associated with an epidural catheter: case report and a review of the literature. *Pharmacotherapy* **19**, 661-6 (1999).
 200. Madsen, C.T. *et al.* Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **280**, 38942-7 (2005).
 201. Madsen, C.T., Jakobsen, L. & Douthwaite, S. *Mycobacterium smegmatis* Erm(38) is a reluctant dimethyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3803-9 (2005).
 202. Mah, T.C. & O'Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34-39 (2001).
 203. Mamalis, N. The increasing problem of antibiotic resistance. *J Cataract Refract Surg* **33**, 1831-2 (2007).
 204. Martin-Casabona, N. *et al.* Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* **8**, 1186-93 (2004).
 205. Martin-de-Hijas, N.Z. *et al.* Usefulness of the Etest for studying tigecycline susceptibility of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents* (2008).
 206. Martín Casabona, N., González Fuente, T. & Fernández Pérez, F. Micobacteriosis: presentación de 38 casos. *Medicina Clínica (Barcelona)* **84**, 651-654 (1985).
 207. Martinez, A., Torello, S. & Kolter, R. Sliding motility in mycobacteria. *J Bacteriol* **181**, 7331-8 (1999).
 208. Martinez_Moragon, E. *et al.* [Lung diseases due to opportunistic environmental Mycobacteria in patients uninfected with human immunodeficiency virus. Risk factors, clinical and diagnostic aspects and course]. *Archivos de Bronconeumologia* **32**, 170-5 (1996).
 209. Matthews, M.R. *et al.* Ventral hernia synthetic mesh repair infected by *Mycobacterium fortuitum*. *Am Surg* **65**, 1035-7 (1999).
 210. McCracken, D. *et al.* Cluster of cases of *Mycobacterium chelonae* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 43-6 (2000).
 211. Meredith, F.T. & Sexton, D.J. *Mycobacterium abscessus* osteomyelitis following a plantar puncture wound. *Clin Infect Dis* **23**, 651-3 (1996).
 212. Metchock, B., Nolte, F.S. & Wallace, R.J. *Mycobacterium*. in *Manual of Clinical Microbiology* (eds. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. & Tenover, R.H.) 399-437 (ASM Press, Washington, D.C., 1999).
 213. Midani, S. & Rathore, M.H. *Mycobacterium fortuitum* infection of ventriculoperitoneal shunt. *South Med J* **92**, 705-7 (1999).
 214. Miron, D. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* osteomyelitis of the cuboid after nail puncture wound. *Pediatr Infect Dis J* **19**, 483-5 (2000).
 215. Moreno, A. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* bacteremia in an immunocompromised patient with a long-term venous catheter [letter]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 423-4 (1996).
 216. Murillo, J. *et al.* Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: an unexpected complication of liposuction and liposculpture. The

-
- Venezuelan Collaborative Infectious and Tropical Diseases Study Group. *Archives of Dermatology* **136**, 1347-52 (2000).
217. Mushatt, D.M. & Witzig, R.S. Successful treatment of *Mycobacterium abscessus* infections with multidrug regimens containing clarithromycin. *Clin Infect Dis* **20**, 1441-2 (1995).
 218. Musial, C.E. *et al.* Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* **26**, 2120-3 (1988).
 219. Mutyala, S., Dieckert, J.P. & Papasian, C.J. *Mycobacterium fortuitum* endophthalmitis. *Retina* **16**, 122-4 (1996).
 220. Nahabedian, S.E. *et al.* Infección de la muñeca por *Mycobacterium fortuitum*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **16**, 149-50 (1998).
 221. Nakajima, Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *J Infect Chemother*. **5**, 61-74. (1999).
 222. Nash, K.A. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel *erm* gene, *erm(38)*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3053-60 (2003).
 223. Nash, K.A. *et al.* Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3476-8 (2006).
 224. Nash, K.A. *et al.* Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother* **55**, 170-7 (2005).
 225. NCCLS. *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes; approved standard. NCCLS document M24-A*, (NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2003).
 226. Nolte, F.S. & Metchock, B. *Mycobacterium*. in *Manual of Clinical Microbiology* (eds. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. & Tenover, R.H.) 400-437 (ASM Press, Washington, D.C., 1995).
 227. Ojha, A. *et al.* GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* **123**, 861-73 (2005).
 228. Ojha, A.K. *et al.* Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* **69**, 164-174 (2008).
 229. Olalla, J. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* complex endocarditis-case report and literature review. *Clin Microbiol Infect* **8**, 125-9 (2002).
 230. Oliver, A. *et al.* Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* **32**, 1298-303 (2001).
 231. Olivier, K.N. *et al.* Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine : An Official Journal of the American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association* **167**, 835-40 (2003).
 232. Olivier, K.N. *et al.* Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine : An Official Journal of the American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association* **167**, 828-34 (2003).
 233. Olson, M.E. *et al.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* **66**, 86-92 (2002).
 234. Oren, B., Raz, R. & Haas, H. Urinary *Mycobacterium fortuitum* infection. *Infection* **18**, 1095-1096 (1990).
 235. Ortiz, A., Esteban, J. & Zamora, N. Molecular identification by random

-
- amplified polymorphic DNA analysis of a pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* due to cross-contamination of clinical samples. *J Med Microbiol* **56**, 871-2 (2007).
236. Palenque, E. Skin disease and nontuberculous atypical mycobacteria. *Int J Dermatol* **39**, 659-66 (2000).
 237. Palmer, J., Flint, S. & Brooks, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 577-88 (2007).
 238. Pang, Y. *et al.* Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1408-12 (1994).
 239. Pankey, G.A. Tygeciline. *J Antimicrob Chemother* **56**, 470-480 (2005).
 240. Pasca, M.R. *et al.* Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3175-8 (2004).
 241. Pasca, M.R. *et al.* mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4775-7 (2005).
 242. Patel, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* **437**, 41-47 (2005).
 243. Peters, D.H. & Clissold, S.P. Clarithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs* **44**, 117-64 (1992).
 244. Pethe, K. *et al.* *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Mol Microbiol* **39**, 89-99 (2001).
 245. Petrelli, D. *et al.* nalysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from cantral venous catheter infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, **25**, 773-781. (2006).
 246. Petrini, B. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *Apmis* **114**, 319-28 (2006).
 247. Pfister, P. *et al.* 23S rRNA base pair 2057-2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A-->G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5180-5 (2005).
 248. Pfister, P. *et al.* The structural basis of macrolide-ribosome binding assessed using mutagenesis of 23S rRNA positions 2058 and 2059. *J Mol Biol* **342**, 1569-81 (2004).
 249. Phillips, K., Blackford, S. & Berry, N. Disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection with multidrug resistance in a patient with panuveitis. *Clin Exp Dermatol* **33**, 256-8 (2008).
 250. Phillips, M.S. & von Reyn, C.F. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis* **33**, 1363-1374. (2001).
 251. Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. in *Statistics and Computing*. (Springer, 2000).
 252. Pinheiro, J.C. *et al.* nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-79. edn (2006).
 253. Plemmons, R.M. *et al.* Otitis media and mastoiditis due to *Mycobacterium fortuitum*: case report, review of four cases, and a cautionary note. *Clin Infect Dis* **22**, 1105-6 (1996).
 254. Porat, M.D. & Austin, M.S. Bilateral knee periprosthetic infection with *Mycobacterium fortuitum*. *J Arthroplasty* **23**, 787-9 (2008).
 255. Primm, T.P., Lucero, C.A. & Falkinham, J.O.r. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**, 98-106 (2004).
 256. R-Development-Core-Team. *R: A Language and Environment for Statistical*

-
- Computing.*, (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2006).
257. Raad, I.I. *et al.* Catheter-related infections caused by the *Mycobacterium fortuitum* complex: 15 cases and review. *Rev Infect Dis* **13**, 1120-5 (1991).
 258. Ramaswamy, A.A. *et al.* Postoperative *Mycobacterium chelonae* endophthalmitis after extracapsular cataract extraction and posterior chamber intraocular lens implantation. *Ophthalmology* **107**, 1283-6 (2000).
 259. Ramon-Garcia, S. *et al.* Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother* **57**, 252-9 (2006).
 260. Rapp, R.P. *et al.* New macrolide antibiotics: usefulness in infections caused by mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann Pharmacother* **28**, 1255-63 (1994).
 261. Rastogi, N., Goh, K.S. & Bryskier, A. In vitro activity of roxithromycin against 16 species of atypical mycobacteria and effect of pH on its radiometric MICs. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 1560-2 (1993).
 262. Recht, J. & Kolter, R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **183**, 5718-24 (2001).
 263. Recht, J. *et al.* Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **182**, 4348-51 (2000).
 264. Reddy, V.C. *et al.* A study of mycobacterial species causing lymphadenitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **39**, 130-5 (2008).
 265. Reddy, V.M. & Hayworth, D.A. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory epithelial cells (HEp-2). *Tuberculosis (Edinb)* **82**, 31-6 (2002).
 266. Reddy, V.M. & Kumar, B. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* **181**, 1189-93 (2000).
 267. Repath, F. *et al.* Prosthetic valve endocarditis due to *Mycobacterium chelonae*. *South Med J* **69**, 1244-6 (1976).
 268. Reviglio, V. *et al.* *Mycobacterium chelonae* keratitis following laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* **14**, 357-60 (1998).
 269. Ridgway, H.F., Rigby, M.G. & Argo, D.G. Adhesion of a *Mycobacterium* sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis. *Appl Environ Microbiol* **47**, 61-67 (1984).
 270. Roberts, G.D., Koneman, E.W. & Kim, Y.K. *Mycobacterium*. in *Manual of Clinical Microbiology* (eds. Balows, A., Hausler, K.L., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. & Shadomy, H.J.) 304-339 (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991).
 271. Roberts, M.C. *et al.* Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemoter* **43**, 2823-2830 (1999).
 272. Rodriguez-Garcia, A. *et al.* Characterization of a two-gene operon epeRA involved in multidrug resistance in *Streptomyces clavuligerus*. *Res Microbiol* **157**, 559-68 (2006).
 273. Rosato, A.E., Lee, B.S. & Nash, K.A. Inducible macrolide resistance in *Corynebacterium jeikeium*. *Antimicrob Agents Chemoter.* **45**, 1982-1989 (2001).
 274. Roth, A. *et al.* Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol* **38**, 1094-104 (2000).
 275. Roussel, T.J. *et al.* Postoperative mycobacterial endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* **107**, 403-6 (1989).

-
276. Roy, V. & Weisdorf, D. Mycobacterial infections following bone marrow transplantation: a 20 year retrospective review. *Bone Marrow Transplant* **19**, 467-70 (1997).
277. Russell, A.D. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *Am J Infect Control* **29**, 259-61 (2001).
278. Russell, A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 1S-3S (2002).
279. Ryan, M.E. *et al.* Periodic fever and skin lesions caused by disseminated *Mycobacterium chelonae* infection in an immunocompetent child. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 270-2 (1996).
280. Safranek, T.J. *et al.* *Mycobacterium chelonae* wound infections after plastic surgery employing contaminated gentian violet skin-marking solution. *N Engl J Med* **317**, 197-201 (1987).
281. Samuels, L.E. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* infection of the sternum. Review of the literature and case illustration. *Arch Surg* **131**, 1344-6 (1996).
282. Sanghvi, C. *Mycobacterium fortuitum* keratitis. *Indian J Med Microbiol* **25**, 422-4 (2007).
283. Sanguinetti, M. *et al.* Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **39**, 816-9 (2001).
284. Santos, R. *et al.* Detection and identification of mycobacteria in the Lisbon water distribution system. *Water Science Technol* **52**, 177-180 (2005).
285. Sarria, J.C. *et al.* Atypical mycobacterial vertebral osteomyelitis: Case report and review. *Clin Infect Dis* **26**, 503-505 (1998).
286. Schinsky, M.F. *et al.* *Mycobacterium septicum* sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**, 575-81 (2000).
287. Schinsky, M.F. *et al.* Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1653-67 (2004).
288. Schulze-Robbecke, R. *et al.* Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber Lung Dis* **76**, 318-23 (1995).
289. Schulze-Robbecke, R. & Fischeder, R. Mycobacteria in biofilms. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **188**, 385-90 (1989).
290. Schulze-Röbbecke, R., Janning, B. & Fischeder, R. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuberc Lung Dis* **73**, 141-144 (1992).
291. Shih, J.Y. *et al.* Nontuberculous mycobacteria isolates: clinical significance and disease spectrum. *J Formos Med Assoc* **96**, 621-7 (1997).
292. Shojaei, H. *et al.* *Mycobacterium elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 5**, 1817-20 (2000).
293. Silcox, V.A., Good, R.C. & Floyd, M.M. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *J Clin Microbiol* **14**, 686-91 (1981).
294. Silva, P.E. *et al.* Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 800-4 (2001).
295. Singh, M. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* endocarditis in a patient with chronic renal failure on hemodialysis. *Pathology* **24**, 197-200 (1992).

-
296. Smith, M.B., Boyars, M.C. & Woods, G.L. Fatal *Mycobacterium fortuitum* meningitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* **23**, 1327-8 (1996).
 297. Sniezek, P.J. *et al.* Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. *Arch Dermatol* **139**, 629-34 (2003).
 298. Sommers, H.M. & Good, R.C. *Mycobacterium*. in *Manual of Clinical Microbiology* (eds. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. & Shadomy, H.J.) 216-248 (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985).
 299. Spell, D.W. *et al.* Native valve endocarditis due to *Mycobacterium fortuitum* biovar *fortuitum*: case report and review. *Clin Infect Dis* **30**, 605-6 (2000).
 300. Springer, B. *et al.* Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 262-7 (1995).
 301. Steingrube, V.A. *et al.* PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **33**, 149-53 (1995).
 302. Stewart, M.W. *et al.* Visual recovery following *Mycobacterium chelonae* endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm* **14**, 181-3 (2006).
 303. Stewart, P.S. Multicellular resistance: biofilms. *Trends Microbiol* **9**, 204 (2001).
 304. Stewart, P.S. & Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138 (2001).
 305. Street, M.L. *et al.* Nontuberculous mycobacterial infections of the skin. *J Am Acad Dermatol* **24**, 208-215 (1991).
 306. Sutcliffe, J., Tait-Kamradt, A. & Wondrack, L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemoter.* **40**, 1817-1824 (1996).
 307. Swanson, D.S. Central venous catheter-related infections due to nontuberculous *Mycobacterium* species. *Pediatr Infect Dis J* **17**, 1163-4 (1998).
 308. Swenson, J.M., Thornsberry, C. & Silcox, V.A. Rapidly growing mycobacteria: testing of susceptibility to 34 antimicrobial agents by broth microdilution. *Antimicrob Agents Chemother* **22**, 186-92 (1982).
 309. Syed, A.U. *et al.* Mediastinitis due to *Mycobacterium fortuitum* infection following Fontan operation in a child. *Scand Cardiovasc J* **31**, 311-3 (1997).
 310. Takiff, H.E. *et al.* Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 362-6 (1996).
 311. Tartaglione, T. Treatment of nontuberculous mycobacterial infections: role of clarithromycin and azithromycin. *Clin Ther* **19**, 626-38; discussion 603 (1997).
 312. Tebas, P. *et al.* Rapid development of resistance to clarithromycin following monotherapy for disseminated *Mycobacterium chelonae* infection in a heart transplant patient. *Clin Infect Dis* **20**, 443-444 (1995).
 313. Tejan_Sie, S.A., Avery, R.K. & Mossad, S.B. *Mycobacterium fortuitum* osteomyelitis in a peripheral blood stem cell transplant recipient. *Scand J Infect Dis* **32**, 94-6 (2000).
 314. Telenti, A. *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**, 175-8 (1993).
 315. Teng, R. & Dick, T. Isoniazid resistance of exponentially growing

-
- Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. *FEMS Microbiol Lett* **227**, 171-4 (2003).
316. TerKonda, R.P. *et al.* Atypical mycobacterial otomastoiditis. *Laryngoscope* **105**, 1275-8 (1995).
317. Thorell, E.A. *et al.* Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infections in Sickle Cell Anemia Patients. *J Pediatr Hematol Oncol* **28**, 678-681 (2006).
318. Tortoli, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* **16**, 319-54 (2003).
319. Toussirot, E., Chevrolet, A. & Wendling, D. Tenosynovitis due to *Mycobacterium avium intracellulare* and *Mycobacterium chelonae*: report of two cases with review of the literature. *Clin Rheumatol* **17**, 152-6 (1998).
320. Trias, J. & Benz, R. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **14**, 283-90 (1994).
321. Tsukamura, M. & Ichiyama, S. Numerical classification of rapidly growing nonphotochromogenic mycobacteria. *Microbiol Immunol* **30**, 863-82 (1986).
322. Udou, T. Extracellular hemolytic activity in rapidly growing mycobacteria. *Can J Microbiol* **40**, 318-21 (1994).
323. Uy, H.S. *et al.* Infectious crystalline keratopathy and endophthalmitis secondary to *Mycobacterium abscessus* in a monocular patient with Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* **127**, 209-10 (1999).
324. Vaerewijck, M.J. *et al.* Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 911-34 (2005).
325. Vail, G. *et al.* Successful treatment of *Mycobacterium fortuitum* prosthetic valve endocarditis: case report. *Clin Infect Dis* **30**, 629-30 (2000).
326. Van Der Beeck, M.T., Bernards, A.T. & Lapid-Gortzak, R. Mycobacterium chelonae keratitis in a patient with Sjogren's syndrome. *Eur J Ophthalmol* **18**, 294-6 (2008).
327. van_Aarem, A. *et al.* Recurrent therapy resistant mastoiditis by *Mycobacterium cheiloneae abscessus*, a nontuberculous mycobacterium. *Int J Pediat Otorhinolaryngol* **43**, 61-72 (1998).
328. Vess, R.W. *et al.* The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. *J Appl Bacteriol* **74**, 215-21 (1993).
329. Vijayaraghavan, R. *et al.* Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. *J Hosp Infect* **64**, 344-7 (2006).
330. Vila, J., Soriano, A. & Mensa, J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infec Microbiol Clin* **26**, 48-55. (2008).
331. Villanueva, A. *et al.* Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* **24**, 1147-53 (1997).
332. Vincent, V. *et al.* *Mycobacterium: Phenotypic and Genotypic Identification.*, 560-584 (ASM Press. , Washington, D.C. , 2003).
333. von Graevenitz, A. & Punter Streit, V. Failure to recognize rapidly growing mycobacteria in a proficiency testing sample without specific request-a wider diagnostic problem? *Eur J Epidemiol* **14**, 519-20 (1998).
334. Wali, M., Goel, N. & Nalini. *Mycobacterium fortuitum* infection of the

-
- endometrium: a rare cause of infertility. *Br J Obstet Gynaecol* **103**, 1046-7 (1996).
335. Walters, M.C. *et al.* Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 317-323 (2003.).
336. Wallace, R.J. & Brown, B.A. *Mycobacterium fortuitum, chelonae, abscessus*. in *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections* (ed. Schlossberg, D.) 372-379 (WB Saunders, Philadelphia, 1998).
337. Wallace, R.J. *et al.* Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. American Thoracic Society Statement. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **156**, S1-S25 (1997).
338. Wallace, R.J., Jr. The clinical presentation, diagnosis, and therapy of cutaneous and pulmonary infections due to the rapidly growing mycobacteria, *M. fortuitum* and *M. chelonae*. *Clin Chest Med* **10**, 419-29 (1989).
339. Wallace, R.J., Jr. Treatment of infections caused by rapidly growing mycobacteria in the era of the newer macrolides. *Res Microbiol* **147**, 30-5 (1996).
340. Wallace, R.J., Jr. *et al.* Comparison of the in vitro activity of the glycylicycline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3164-7 (2002).
341. Wallace, R.J., Jr. *et al.* Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 764-7 (2001).
342. Wallace, R.J., Jr. & Brown, B.A. Catheter sepsis due to *Mycobacterium chelonae*. *J Clin Microbiol* **36**, 3444-5 (1998).
343. Wallace, R.J., Jr., Brown, B.A. & Griffith, D.E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**, 453-90 (1998).
344. Wallace, R.J., Jr., Brown, B.A. & Onyi, G.O. Skin, soft tissue, and bone infections due to *Mycobacterium chelonae chelonae*: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. *J Infect Dis* **166**, 405-12 (1992).
345. Wallace, R.J., Jr. *et al.* Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. *J Infect Dis* **159**, 708-16 (1989).
346. Wallace, R.J., Jr. *et al.* Treatment of nonpulmonary infections due to *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* on the basis of in vitro susceptibilities. *J Infect Dis* **152**, 500-14 (1985).
347. Wallace, R.J., Jr. *et al.* Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis* **5**, 657-79 (1983).
348. Wallace, R.J., Jr. *et al.* Clinical trial of clarithromycin for cutaneous (disseminated) infection due to *Mycobacterium chelonae*. *Ann Intern Med* **119**, 482-6 (1993).
349. Watt, G. In-vitro sensitivities and treatment of less common mycobacteria. *J Antimicrob Chemother* **39**, 567-574 (1997).
350. Weisblum, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antmicrob Agents Chemother* **39**, 577-585 (1995).
351. Wilson, R.W. *et al.* *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species
- 192

-
- related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1751-64 (2001).
352. Wilson, S., Cascio, B. & Neitzschman, H.R. Radiology case of the month. Nail puncture wound to the foot. *Mycobacterium chelonae* osteomyelitis. *J La State Med Soc* **151**, 251-2 (1999).
 353. Winthrop, K.L. *et al.* An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. *N Engl J Med* **346**, 1366-71 (2002).
 354. Wolinsky, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Res Dis* **119**, 107-159 (1979).
 355. Wolinsky, E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin Infect Dis* **15**, 1-10 (1992).
 356. Wong, D.A. *et al.* Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex species, and other commonly isolated mycobacteria. *J Clin Microbiol* **39**, 3768-71 (2001).
 357. Woods, G.L. *et al.* Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol* **38**, 656-61 (2000).
 358. Woods, G.L. *et al.* Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol* **37**, 1676-82 (1999).
 359. Wozniak, D.J. *et al.* Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PA01 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7907-7912 (2003).
 360. Wright, J.E. Non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis. *Aust N Z J Surg* **66**, 225-8 (1996).
 361. Yang, S.C. *et al.* High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1958-62 (2003).
 362. Yorganci, K. *et al.* In vitro evaluation of the antibacterial activity of three different central venous catheters against gram-positive bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**, 379-384 (2002).
 363. Zambrano, M.M. & Kolter, R. Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together. *Cell* **123**, 762-4 (2005).
 364. Zamora, N. *et al.* In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* **13**, 902-7 (2007).
 365. Zhang, Y. *et al.* Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. *J Clin Microbiol* **35**, 3132-9 (1997).
 366. Zhang, Y. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation. *J Clin Microbiol* **42**, 5582-7 (2004).
 367. Zhao, X. *et al.* Bactericidal activity and target preference of a piperazinyl-cross-linked ciprofloxacin dimer with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **58**, 1283-6 (2006).



ANEXO

