

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD FENO-GENOTÍPICA DE
AISLADOS CLÍNICOS DE MYCOBACTERIUM KANSASII
DEL ÁREA DE INFLUENCIA DEL HCUV.

MARÍA DEL REMEDIO GUNA SERRANO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- Dr. Juan García de Lomas Barrionuevo
- Dr. Javier Aznar Martín
- Dr. Manuel Casal Román
- Dr. Antonio Marcilla Díaz
- Dr. José Miguel Nogueira Crito

Va ser dirigida per:

Dr. Rafael Borrás Salvador

Dr. Carlos Muñoz Collado

©Copyright: Servei de Publicacions
María del Remedio Guna Serrano

Dipòsit legal: V-3431-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7978-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

Universitat de València. Estudi General
Departament de Microbiologia i Ecologia



**Estudio de la diversidad feno-genotípica de
aislados clínicos de *Mycobacterium kansasii* del área
de influencia del HCUV.**

Tesis Doctoral
María del Remedio Guna Serrano

Valencia, 2007

Rafael Borrás Salvador , Profesor Titular de Microbiología de la Universitat de València (Estudi General) y Jefe de Sección de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y Carlos Muñoz Collado, Profesor Titular de Microbiología de la Universitat de València (Estudi General)

Informan,

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la diversidad fenotípica de aislados clínicos de *Mycobacterium kansasii* del área de influencia del HCUV”, presentada por Doña María del Remedio Guna Serrano, Licenciada en Medicina, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios de la Sección Departamental de Microbiología de la Facultad de Medicina y Odontología y del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Y mediante este escrito autorizamos su presentación para optar al grado de Doctor en Medicina, en Valencia a veintisiete de Febrero de dos mil siete.

Fdo: Prof. Rafael Borrás Salvador

Fdo: Prof. Carlos Muñoz Collado

A mis padres

A Fernando

Agradecimientos

Mi agradecimiento más sincero al Dr. Rafael Borrás Salvador, por sus innumerables horas de trabajo dedicadas a esta tesis, por aportar ese toque de genialidad que siempre logra sorprenderme y por supuesto, por su inestimable amistad. Ha sido un verdadero honor trabajar junto a él durante estos años, con sus buenos momentos pero también con sus momentos difíciles. Para él, todo mi cariño, respeto y amistad.

A mi queridísima compañera “del piso de arriba”, Dra Nieves Orta, participe en estos años de mi trabajo y mis agobios, gracias por compartir esos momentos, pero sobre todo gracias por los momentos de risas y complicidad que hemos pasado juntas. A mis chicos del club de los “agotes” (Dr. David Navalpotro y Dr. Oscar Fraile), que me consta han disfrutado de nuestra compañía y han sido partícipes de mi trabajo.

A la Dra. Concepción Gimeno Cardona, por su apoyo en estos años, por la oportunidad profesional brindada y por su amistad. Para ella todo mi cariño.

Al Dr. Carlos Muñoz Collado, por su ayuda en la realización de esta tesis, sus sabios consejos y su serena palabra. A la Dra. Victoria Domínguez, amiga y compañera en el arduo camino de doctorandas.

A todos los miembros del Servicio de Microbiología del HCUV por su ayuda en mi trabajo, y por hacerme sentir como en casa. Gracias a Mati, Inés, Rosa Man, Amparo la secre, Concha, Chelo....., los chicos del turno de tarde (los que están y los que ya se fueron)... Todo mi cariño para vosotros. A Alberto Garay y Carmen Mallea: gracias por compartir conmigo vuestra experiencia micobacteriana y saber hacer.

A mis padres, Manolo y Vicen, por confiar ciegamente en mí durante estos años, por su apoyo incondicional. Gracias por vuestro esfuerzo y por ser como sois. Para vosotros todo mi amor. A Manolo, Mónica y Tute, siempre conmigo.

A mis tíos Lola y Antonio, por su cariño; especialmente para ti, tío...

A Fernando, porque sin su apoyo no hubiese sido posible la realización de este trabajo; por estar siempre a mi lado y hacer que todo sea más fácil. Con amor...

A Sandra, por mis largas horas de ausencia...

ÍNDICE

1	Introducción	1
1.1	Primeras descripciones e interés médico.	2
1.2	Características biológicas.	4
1.2.1	Morfología y estructura parietal.	4
1.2.2	Características culturales y fisiológicas.	6
1.2.3	Biodiversidad.	7
1.3	Aspectos epidemiológicos.	11
1.3.1	Hábitat y mecanismo de transmisión.	11
1.3.2	Factores epidemiológicos, incidencia y prevalencia.	14
1.3.3	Epidemiología molecular.	18
1.4	Patogénesis.	20
1.4.1	Determinantes de patogenicidad.	20
1.4.2	Factores dependientes del hospedador.	24
1.4.3	Colonización frente a Infección.	25
1.5	Manifestaciones clínicas.	26
1.5.1	Infecciones localizadas.	26
1.5.2	Enfermedad diseminada.	32
1.6	Diagnóstico microbiológico.	33
1.6.1	Procedimiento diagnóstico general.	33
1.6.2	Identificación al nivel de especie.	36
1.6.3	Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.	40
1.7	Tratamiento.	43

2	Objetivos	47
3	Material y métodos	51
3.1	Origen de los aislados.	52
3.2	Mantenimiento de los aislados.	59
3.3	Identificación de los aislados.	59
3.3.1	Identificación fenotípica.	59
3.3.2	Identificación molecular al nivel de especie.	60
3.3.3	Identificación genotípica.	61
3.4	Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.	64
3.4.1	Compuestos ensayados.	65
3.4.2	Estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	66
3.4.3	Evaluación de la utilidad del Sistema Bactec [®] MGIT 960 para los estudios de sensibilidad.	68
3.5	Análisis de la diversidad genética.	70
3.5.1	Estudio del DNA cromosómico mediante PFGE.	70
3.5.2	Estudio de DNA cromosómico mediante AFLP.	74
4	Resultados	81
4.1	Resultados de la identificación fenotípica.	82
4.2	Resultados sobre la identificación molecular.	85
4.3	Resultados del estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.	86
4.4	Resultados de la evaluación del sistema Bactec [®] MGIT 960 para los estudios de sensibilidad.	91

4.5	Resultados del estudio del polimorfismo genético mediante PFGE.	94
4.6	Resultados del estudio del polimorfismo genético mediante AFLP.	97
4.6.1	Resultados obtenidos con el <i>primer</i> Apa-A.	98
4.6.2	Resultados obtenidos con el <i>primer</i> Apa-C.	102
4.6.3	Resultados obtenidos con el <i>primer</i> Apa-T.	105
4.6.4	Resultados del análisis global.	108
4.6.5	Poder discriminatorio del ensayo AFLP.	113
5	<u>Discusión</u>	115
5.1	Sobre la identificación convencional y la diversidad fenotípica.	116
5.2	Sobre la identificación molecular y la diversidad genética.	117
5.3	Sobre la sensibilidad a los antibióticos.	119
5.4	Sobre la evaluación del sistema Bactec [®] MGIT 960 para los estudios de sensibilidad.	126
5.5	Sobre el análisis del polimorfismo genético.	128
6	<u>Conclusiones</u>	133
7	<u>Bibliografía</u>	137

1 Introducción

1.1 Primeras descripciones e interés médico.

Mycobacterium kansasii fue descrito en 1953 por Buhler & Pollak, quienes atendiendo a sus características culturales lo denominaron “*yellow bacillus*”. Estos autores describieron el aislamiento en dos casos humanos de unas micobacterias que causaban enfermedad pulmonar, pero que mostraban una limitada patogenicidad en los animales de experimentación (Buhler & Pollak, 1953; Pollak & Buhler, 1955). Dichos microorganismos se caracterizaban por producir colonias pigmentadas, con una gama cromática que variaba del color crema al amarillo o amarillo-naranja, que se acentuaba con el tiempo y con la incubación a temperatura ambiente.

En 1955, en una carta anónima, Runyon (1955) describió el papel de la luz en la pigmentación de estos organismos, y acuñó el término “fotocromógenos” para describir a los microorganismos que producían pigmento sólo tras la exposición a la luz. En ese mismo año, el nombre de *M. kansasii* fue aplicado por Hauduroy (1955) a las cepas fotocromógenas de Buhler & Pollak. Posteriormente, las micobacterias de crecimiento lento que mostraban este atributo, fueron asignadas al grupo I de la clasificación de Runyon (Runyon, 1958; Runyon, 1959). El papel del oxígeno y de la edad de los cultivos en la expresión de la fotocromogenicidad de *M. kansasii* fue demostrado por Wayne & Doubek (1964).

Durante varios años, el aislamiento de *M. kansasii* a partir de una muestra clínica fue invariablemente interpretado como que este organismo era necesariamente el agente etiológico de la enfermedad que afectaba al paciente (Wayne, 1984). Sin embargo en 1962, fue descrita la existencia de dos variantes que se diferenciaban atendiendo a la intensidad de la actividad catalasa; una de ellas con actividad catalasa débil, correspondía a aislados ambientales que fueron considerados como carentes de significación etiológica (Wayne, 1962), lo que unido al aislamiento de cepas con actividad catalasa elevada a partir de agua potable (Bailey *et al.* 1970; Steadham, 1980), determinó que la significación clínica de este organismo, como la de las

restantes micobacterias ambientales, se base en criterios muy estrictos: evidencia clínica de enfermedad sin filiación etiológica, asociada al aislamiento repetido de una misma especie micobacteriana o al aislamiento de una micobacteria a partir de una lesión cerrada (Anonymous, 1974).

En 1975, un estudio de la British Thoracic and Tuberculosis Association, informó de 70 casos de infección por micobacterias oportunistas en Inglaterra y Gales, 53 de los cuales estaban producidos por *M. kansasii*. En este mismo estudio, se demostró que la exposición al polvo generado en algunos ambientes de trabajo, parecía estar directamente relacionada con la infección por *M. kansasii*, y que dicha asociación era más frecuente que en la tuberculosis (Anonymous, 1975). Observación que fue corroborada por Marks (1975), quién demostró una asociación significativa entre la infección por *M. kansasii* y la exposición al polvo en determinados ambientes laborales.

Actualmente, el interés médico de *M. kansasii* deriva del constante incremento en la prevalencia de las infecciones producidas por micobacterias no tuberculosas, así como, del avance en la precisión y rapidez de los métodos diagnósticos y en las posibilidades terapéuticas (Wallace *et al.*, 1997). *M. kansasii* es considerado la segunda micobacteria no tuberculosa, después de *Mycobacterium avium* complex, capaz de producir enfermedad pulmonar y diseminada en pacientes tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, en muchas partes del mundo (Horsburgh & Selik, 1989; Parenti *et al.*, 1995; Wallace *et al.*, 1997).

Aunque la incidencia de este patógeno varía mucho según la región geográfica considerada, incluso dentro de un mismo país (Rodríguez *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2005), en la última década se ha producido un aumento importante en el número de casos de infección por este microorganismo en todo el mundo, de manera que en nuestro país se muestra en varias series como una de las dos micobacterias no tuberculosas que más frecuentemente causan enfermedad clínicamente destacable (Hernández *et al.*, 1990; Fraile *et al.*, 2006).

1.2 Características biológicas.

M. kansasii es un Firmicutes que está incluido en la familia Mycobacteriaceae y en el género *Mycobacterium*. Por lo tanto, son bacilos grampositivos con quimiotipo parietal tipo IV (ácido meso-diaminopimérico y arabinogalactano), ácido-alcohol resistentes, no capsulados, no esporulados, inmóviles, quimiorganótrofos, exigentes culturalmente, aerobios estrictos, de metabolismo oxidativo, catalasa positivos y citocromo-oxidasa negativos.

1.2.1 Morfología y estructura parietal.

Desde el punto de vista morfológico, *M. kansasii* tiene las características propias de las micobacterias, es decir son bacilos grampositivos, ácido-alcohol resistentes, aflagelados, acapsulados, y no esporulados (Tison *et* Carbonelle, 1972).

La observación microscópica tras tinción por el método de Ziehl-Neelsen revela que el cultivo está conformado por bacilos ácido-alcohol resistentes, pero la célula bacteriana es generalmente más larga y ancha que las restantes micobacterias. La singularidad morfológica de esta especie viene determinada por la ausencia de homogeneidad tintorial, que se traduce por la presencia de bandas o gránulos somáticos que confieren a la célula un característico aspecto atigrado o acebrado. Además, lo habitual es que se disponga en cordones curvos (Tison *et* Carbonelle, 1972; Alcaide y Benítez, 1999).

La estructura y función de la pared celular son aspectos muy estudiados de las micobacterias, aunque no completamente conocidos (Draper, 1991). La menor permeabilidad de la pared celular se cree que juega un papel importante en la resistencia intrínseca a muchos antimicrobianos, fenómeno que alcanza niveles máximos cuando se trata de las micobacterias no tuberculosas (Nikaido & Jarlier, 1991). También se ha relacionado la envoltura con factores de patogenicidad, virulencia e interacción molecular con las células del hospedador (Rastogi & Barrow, 1994).

La envoltura celular de las micobacterias es una estructura compleja, con gran riqueza lipídica, puesto que la pared celular contiene entre el 30-40% del total de lípidos bacterianos (Rastogi & Barrow, 1994). Existen varios modelos para explicar el ordenamiento de las distintas moléculas que forman la estructura parietal (McNeil & Brennan, 1991; Minnikin, 1991; Rastogi, 1991). La capa más interna es la membrana plasmática, similar a la de otras bacterias, que está formada por una bicapa lipídica que interacciona con proteínas. El esqueleto o núcleo de la pared celular, está compuesto por tres macromoléculas unidas covalentemente y que son constantes en todas las especies: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos (Figura 1.1).

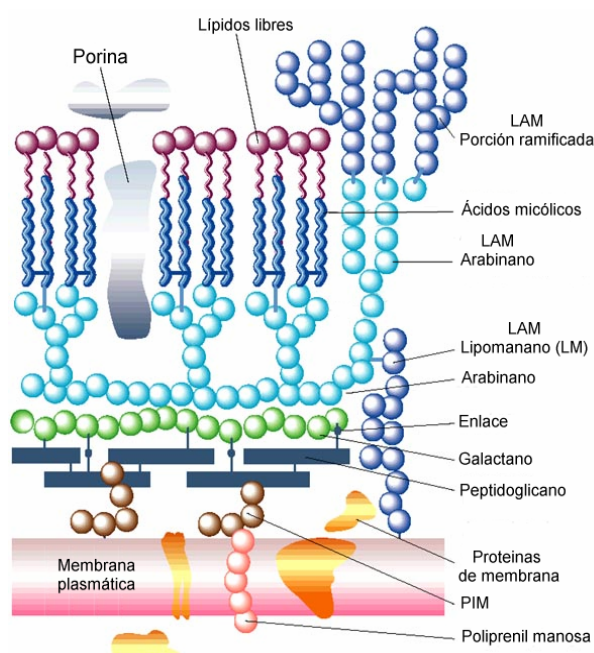


Figura 1.1.- Esquema de la pared de *Mycobacterium* spp.

([http:// oregonstate.edu/~mahmudt/projects.html](http://oregonstate.edu/~mahmudt/projects.html))

Otro de los lipopolisacáridos encontrados en todas las micobacterias es el lipoarabinomanano, que es parte esencial de la envoltura celular y que parece estar anclado a la membrana plasmática desde donde se extiende hacia el exterior de la pared. Este lipopolisacárido posee actividades biológicas que modulan el sistema inmune del hospedador como la supresión inespecífica

de la activación de los linfocitos T, inhibición de la presentación de antígenos e inhibición de la actividad de los macrófagos (McNeil & Brennan, 1991).

1.2.2 Características culturales y fisiológicas.

M. kansasii posee las características fisiológicas generales inherentes a las micobacterias; es decir, se trata de microorganismos quimioorganótrofos, aerobios estrictos y de metabolismo oxidativo. Poseen actividad catalasa y peroxidasa, y son exigentes nutricionalmente. Dicha exigencia nutricional es compleja, requiriendo para su crecimiento oligoelementos, asparragina, glicerol, hierro y lípidos, entre otros compuestos. Sí bien es cierto que este organismo exhibe actividad catalasa, se ha descrito la existencia de aislados con actividad catalasa débil (Wayne, 1962).

Este organismo está incluido en el Grupo I de la clasificación de Runyon (1959) sobre las micobacterias cultivables no tuberculosas, por las características que reúne: i) velocidad de crecimiento lenta; ii) producción de pigmento tras exposición a la luz (fotocromogenicidad).

En las condiciones habituales de incubación de un laboratorio clínico, es decir, en estufa de 37°C y en atmósfera convencional, *M. kansasii* es capaz de desarrollarse de forma ostensible tras 10-12 días de incubación, aunque presenta un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento entre 32°C y 42°C. En los medios sólidos (*vgr* medio de Löwenstein-Jensen), las colonias presentan una morfología intermedia, entre lisas y rugosas, con un centro liso, denso, rodeado de una zona hipodensa, y se caracterizan por su fotocromogenicidad que hace que desarrollen una coloración amarillenta, debido al depósito de cristales de β -caroteno tras la exposición a la luz (Wallace *et al.*, 1997).

Esta especie muestra una gran homogeneidad fenotípica y las características morfo-culturales y bioquímicas más relevantes son: su crecimiento lento, superior a 7 días en medios de cultivo sólidos; la formación de colonias lisas–rugosas (SR) fotocromógenas; la presencia de actividad

catalasa, nitrato-reductasa y la capacidad de hidrolizar el Tween[®] 80 (Wallace *et al.*, 1997; Alcaide y Benítez, 1999) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1.- Características culturales y bioquímicas de *M. kansasii*.

Característica	Resultado	Característica	Resultado
Crecimiento lento (>7 días)	+	Catalasa semicuantitativa (>45mm) ^c	+ (93%)
Tipo de colonias	SR ^a	Hidrólisis del Tween [®] 80	+ (99%)
Producción de pigmento	+	Tolerancia NaCl 5% (28°C)	-
Fotocromogenicidad	+ (96%)	Crecimiento en T2H (10 µg/ml)	+
Crecimiento a 25°C/37°C	+ ^d	Resistencia al TCH (5 µg/ml)	+
Crecimiento a 42°C	V	Reducción del telurito potásico	-/+ (31%)
Crecimiento a 45°C	-	Nicotinamida	+
Niacina	- (96%)	Propionamida	-
Reducción de nitratos	+ (99%)	B-galactosidasa	-
Arilsulfatasa (3 días/10 días)	-/+	α-esterasa	-
Ureasa	-/+ (49%)	Fosfatasa ácida	+
Pirazinamidasa (4 días)	-	Peroxidasa	+
Catalasa a 68°C	+ (91%)	Crecimiento en McConkey sin cristal violeta	-

^a colonias lisas/colonias rugosas o intermedias; ^d temperatura óptima de crecimiento 35°C; ^cSe describen dos grupos de cepas de *M. kansasii*: los productores de enfermedad con >45 mm de burbujas y los no productores de enfermedad con <45mm de burbujas.

1.2.3 Biodiversidad.

Algunos autores han relacionado ciertos aspectos fenotípicos con el poder patógeno de este microorganismo. Tal es el caso de los estudios de Wayne (1962) y Belisle & Brennan (1989), en los que se señala a los aislados con débil actividad catalásica como carentes de significación patogénica (Wayne 1962) y se relaciona a los productores de colonias R, frente a las variantes S, como inductores en modelo experimental de infecciones que persisten más tiempo (Belisle & Brennan, 1989); sin embargo, las bases genéticas de estas variaciones no son conocidas.

1.2.3.1 Biodiversidad fenotípica.

Tortoli *et al.* (1994a), en un estudio sobre las características fenotípicas realizado con 71 cepas identificadas por métodos convencionales, el 26,8% de las cuales no hibridaban con la sonda Gen-Probe, observaron que

la variabilidad era muy limitada. En el caso de las pruebas diferenciales clásicas refieren que aunque todas las cepas hidrolizaban el Tween[®] 80, dicha actividad era más rápida en las cepas hibridantes y que dos de estas presentaban características atípicas: una carecía de actividad nitrato-reductasa y otra era niacina positiva.

El estudio de actividades enzimáticas mediante api[®] ZYM, les permitió constatar que: i) todas las cepas carecían de actividad α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucoronidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y α -manosidasa; ii) todas ellas presentaban actividad C4 esterasa, C8 esterasa lipasa, C14 lipasa, leucina arilamidasa, cistina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS BI-fosfohidrolasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa; iii) los resultados para las restantes actividades fueron variables (fosfatasa alcalina, 98,6%; α -fucosidasa, 73,2%). Todo lo cual les permitió definir tres biotipos (1 a 3), y la relación existente entre el biotipo 2 y las cepas aisladas de pacientes VIH, ya que en dicho tipo, caracterizado por la ausencia de actividad α -fucosidasa, quedaban incluidos los aislados no identificados mediante Gen-Probe y la mayoría de los aislados procedentes de pacientes VIH positivos (Tortoli *et al.*, 1994a) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2.- Esquema de biotipia según Tortoli *et al.* (1994b).

Biotipo	α – fucosidasa	Fosfatasa alcalina	Sonda AccuProbe	Frecuencia (%)
1	+	+	+	71,8
2	-	+	-	1,4
3	+	-	+	26,8

En un trabajo presentado por el grupo GEMKA en el que se analiza la biodiversidad de los aislamientos clínicos de *M. kansasii* en España mediante su caracterización genotípica y fenotípica, en el periodo comprendido entre los años 2000 y 2003, se describe la existencia de ocho biotipos (Tabla 1.3), de los cuales el más prevalente es el biotipo 1 con un 83,9% (Calatayud *et al.*, 2004).

Tabla 1.3.- Esquema de biotipia según el grupo GEMKA (Calatayud *et al.*, 2004).

Biotipo	Nitratasa	Catalasa 68°	Hidrólisis del	Reducción del	Frecuencia (%)
1	+	+	+	+	83,9
2	+	+	-	+	5,6
3	+	+	+/-	+	4,9
4	-	+	+	+	2,8
5	-	+	-	+	0,7
6	-/+	+	+	-	0,7
7	+	-	+	-	0,7
8	-	+	+/-	+	0,7

Jiménez-Pajares *et al.* (2005), señalan que esta especie muestra una gran variabilidad fenotípica, ya que el 42,6% de las cepas incluidas en su estudio presentaban características fenéticas distintas a las descritas como típicas de *M. kansasii*, en lo que se refiere a aspectos tan fundamentales como la producción de pigmento tras fotoinducción, acumulación de niacina y reducción de los nitratos; todo ello, unido a la rapidez de la hidrólisis del Tween 80 y a la actividad ureolítica, les permitió establecer la existencia de 17 biotipos, de los cuales el predominante era el biotipo 1 (Tabla 1.4).

Tabla 1.4.- Esquema de biotipia de Jiménez-Pajares *et al.* (2005).

Biotipo	Pigmento	Nitratasa	Niacina	Ureasa	Hidrólisis del Tween 80*	Frecuencia (%)
1	+ f	+	-	+	+ 1 día	44,6
2	+ f	+	-	-	+ 1 día	12,7
3	+ f	+	-	+	+ 3 día	12,1
4	+ f	+	-	-	+ 3 día	7,7
5	+ f	+	-	+	+ 5 día	4,4
6	+ f	+	-	-	+ 5 día	1,0
7	+ f	+	-	+	-	1,7
8	+ f	-	-	+	+ 1 día	5,0
9	+ f	-	-	-	+ 1 día	1,0
10	+ f	-	-	+	+ 3 día	2,7
11	+ f	-	-	-	-	0,3
12	+ f	+	+	+	+ 1 día	2,7
13	+ f	+	+	+	+ 3 día	0,3
14	-	+	-	+	+ 1 día	0,3
15	-	+	-	+	+ 3 día	0,3
16	-	+	-	-	+ 5 día	1,0
17	-	-	-	+	+ 1 día	1,0

f: fotocromógeno; * : reacción positiva en el tiempo señalado.

1.2.3.2 Diversidad genética.

Desde hace más de diez años, diferentes métodos de tipificación molecular se han empleado para el estudio de *M. kansasii* (Zhang *et al.*, 2004a). El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA (Ross *et al.*, 1992), la amplificación de la región espaciadora 16S-23S rRNA (Abed *et al.*, 1995), la PCR y análisis de restricción del gen *hsp-65* (PRA) (Plikaytis *et al.*, 1992; Telenti *et al.*, 1993), y la detección de la secuencia de inserción *IS1652* (Yang *et al.*, 1993) permitieron determinar que *M. kansasii* contenía subespecies genéticamente distintas, que no se podían poner de manifiesto mediante las pruebas bioquímicas convencionales.

En el estudio realizado por Ross *et al.* (1992), se caracterizaron aislados de Australia, Bélgica, Japón, Sudáfrica y Suiza mediante una sonda de DNA específica de *M. kansasii* (pMK1-9); de los 105 aislados estudiados, 20 dieron un resultado negativo con esta técnica, y de ellos 19 mostraron diferencias parciales en la secuenciación del gen 16S rRNA. Sin embargo, las 85 cepas restantes con resultado positivo tenían en común la mayoría de las bandas, con variaciones menores en las bandas de más alto peso molecular, indicando que dentro de este grupo la variabilidad genética era baja.

Los estudios de Telenti *et al.* (1993) y Devalois *et al.* (1997), mediante análisis de los fragmentos de restricción del amplicón del gen *hsp65* (PRA), demostraron que los aislados de origen humano y ambiental podían ser clasificados en cinco subespecies o grupos taxonómicos (I a V). Estos resultados fueron confirmados por Picardeau *et al.* (1997) y Alcaide *et al.* (1997).

Posteriormente, se han descrito dos nuevos subtipos (VI y VII) mediante PRA y secuenciación de la región espaciadora 16S-23S rRNA (Richter *et al.*, 1999), y secuenciación del gen 16S rRNA (Taillard *et al.*, 2003), respectivamente. De los siete grupos genéticos descritos, *M. kansasii* I es el subtipo causante de enfermedad en el hombre más prevalente en todo el mundo.

En España, los estudios de Jiménez-Pajares *et al.* (2005) y Alcaide *et al.* (2006) demuestran inequívocamente que el genotipo I es el más frecuentemente aislado a partir de muestras clínicas, con frecuencias que varían entre el 86,6% y el 92,5 %, respectivamente. Cardeñosa *et al.* (2006) en un estudio realizado sobre 230 aislamientos procedentes de 15 comunidades autónomas españolas, concluyen que a pesar de la heterogeneidad genética de la especie, un solo subtipo (genotipo I) es el más prevalente, caracterizándose éste por una importante homogeneidad fenética.

1.3 Aspectos epidemiológicos.

1.3.1 Hábitat y mecanismo de transmisión.

Numerosos estudios demuestran que *M. kansasii* es una micobacteria ambiental cuyo hábitat natural es el agua, pero su presencia en este elemento no es universal. Este organismo ha sido aislado de aguas superficiales, de aguas para uso industrial y de aguas potabilizadas, tanto de sistemas de distribución doméstica (1,5% a 49%) como de redes hospitalarias (3,5% a 20,3%) (Tabla 1.5), así como, a partir de las aguas de acuarios, en la región de Moldavia (Beran *et al.*, 2006).

Existen varias razones que justifican la presencia de micobacterias ambientales en las redes de distribución del agua, como son su elevada resistencia innata al cloro y otros biocidas, relacionada con la impermeabilidad celular debida a la peculiar composición parietal micobacteriana, y su supervivencia durante largos periodos de tiempo en situaciones extremas de carencia de nutrientes, debida a su capacidad de adaptación a condiciones medioambientales adversas, que se ve favorecida por la tasa de división celular (Primm *et al.*, 2004).

Steadham (1980) y Joynson (1979), refieren su aislamiento a partir de muestras de agua potable con cloro libre entre 0,1 y 0,2 mg/L y su supervivencia *in vitro* en agua potable durante más de 12 meses. Además, las micobacterias ambientales debido a la hidrofobicidad celular tienen la capacidad

de adherirse a superficies, y por tanto pueden dar lugar a biofilms que facilitan la colonización y su persistencia en los sistemas de distribución (Primm *et al.* 2004; Vaerewijck *et al.*, 2005). Schulze-Robbecke & Fischeder (1989) refieren la formación de biofilms que contenían micobacterias, en el interior de tubos de silicona perfundidos durante 10 meses con agua de un sistema de distribución contaminado naturalmente por *M. kansasii* y *Mycobacterium flavescens*, y la recuperación del primero a razón de 2×10^5 UFC/cm².

Tabla 1.5.- Resumen de algunos estudios sobre la presencia de *M. kansasii* en fuentes ambientales.

País	Referencia	Fuente	Aislamiento de <i>M. kansasii</i> (%)
Alemania	Havelaar <i>et al.</i> (1985)	Agua de jacuzzis	+ 3 veces que MAC
		Agua de piscina	-
	Fischeder <i>et al.</i> (1991)	Agua potable de uso doméstico	+
		Agua de plantas de potabilización	-
Chequia	Kaustova <i>et al.</i> (1981)	Agua de plantas de potabilización	-
		Agua potable de uso doméstico	+ (1,8)
		Agua potable de uso hospitalario	+ (3,5)
	Slosarek <i>et al.</i> (1994)	Agua potable	+ (1,5 a 1,9)
	Chobot <i>et al.</i> (1997)	Agua potable de uso doméstico	+ (7)
		Agua para uso industrial	+ (43,7)
		Suelo	-
Pequeños roedores		-	
China	Chang <i>et al.</i> (2002)	Agua potable de uso hospitalario	+ (4,1)
Finlandia	Torvinen <i>et al.</i> (2004)	Agua potable	-
Francia	Le Dantec <i>et al.</i> (2002)	Agua potable	-
EEUU	Steadham (1980)	Agua potable	+ (42,1)
	Carson <i>et al.</i> (1988)	Agua potable de centros de hemodiálisis	-
	Bland <i>et al.</i> (2005)	Aguas superficiales	+
Holanda	Engel & Berwald (1980b)	Agua potable de uso doméstico	+ (49)
India	Parashar <i>et al.</i> (2004)	Aguas superficiales	+
		Suelo	-
Portugal	Santos <i>et al.</i> (2005)	Agua potable	+ (21,5)
Reino Unido	Wright <i>et al.</i> (1985)	Agua potable de uso hospitalario	+ (20,3)
Sudáfrica	September <i>et al.</i> (2004)	Agua potable	-

Por otro lado, las micobacterias acuáticas en su hábitat natural, en estado planctónico o formando agregados, se relacionan con otros organismos algunos de los cuales son predadores natos, como las amebas de vida libre. Pero las micobacterias acuáticas, a diferencia de las telúricas, son capaces de sobrevivir y multiplicarse en el interior de estos organismos (Primm *et al.*, 2004; Cirilo *et al.*, 1997). Thomas *et al.* (2006), en un estudio sobre la biodiversidad de las amebas y de las bacterias resistentes a éstas en la red de distribución de agua de un hospital, refieren el aislamiento de *Mycobacterium gordonae*, *M. kansasii* y *Mycobacterium xenopi* en el 20,5% de las muestras analizadas, y hallan una asociación significativa entre la presencia de amebas y de micobacterias ($p= 0,0009$), lo que les sugiere que las amebas constituyen un reservorio de estos organismos.

M. kansasii se ha recuperado en muy pocas ocasiones de aguas fluviales y lacustres (Collins *et al.*, 1984), y excepcionalmente a partir de muestras telúricas o de animales (Wolinsky & Ryneerson, 1968). Estudios recientes realizados en Chequia e India describen su ausencia en el reservorio telúrico (Chobot *et al.*, 1997; Parashar *et al.*, 2004) y en pequeños roedores (Chobot *et al.*, 1997). No obstante, su aislamiento a partir de otras fuentes animales está documentado microbiológicamente: cucarachas (*Periplaneta americana*) recolectadas en hospitales de Taiwan (Pai *et al.*, 2003), a partir del líquido pleural de un perro en EEUU (Pressler *et al.*, 2002), de nódulos linfáticos de ganado vacuno en Irlanda del Norte (Hughes *et al.*, 2005), y de muestras tisulares de peces clínicamente sanos de acuarios de la región de Moldavia, Chequia (Beran *et al.*, 2006).

Todavía no se ha podido establecer una relación epidemiológica clara entre estos reservorios naturales y la enfermedad humana. La infección parece que se adquiere a partir del medio ambiente, que es su reservorio principal, a través de agua contaminada o aerosoles, siendo rara la transmisión interhumana, que no ha podido ser totalmente demostrada. No obstante, hay que tener presente que el aislamiento de *M. kansasii* no es una prueba definitiva de enfermedad, ya que puede actuar como agente contaminante

circunstancial, suponiendo más una colonización del tracto respiratorio que una infección (Ahn *et al.*, 1982).

1.3.2 Factores epidemiológicos, incidencia y prevalencia.

Desde mediados de la década de los años 80 se ha observado un cambio importantísimo en la prevalencia de las micobacterias no tuberculosas, que se ha traducido por un notable incremento porcentual respecto al total de aislamientos micobacterianos; además, existe una marcada variabilidad geográfica en cuanto a la prevalencia de enfermedades causadas por dichas micobacterias y las especies implicadas (Wallace *et al.*, 1997). Martín-Casabona *et al.* (2004) refieren que en Bélgica, Chequia y en la costa mediterránea española predominan las micobacterias no tuberculosas pigmentadas, mientras que en Dinamarca, Finlandia, Reino Unido, Turquía y en la costa atlántica brasileña predominan los aislados no pigmentados. *M. kansasii* es la causa más frecuente de enfermedad pulmonar por micobacterias oportunistas en el Reino Unido, Oeste de Europa y diversas partes de los EEUU (Evans *et al.*, 1996b).

En Estados Unidos, desde hace años, *M. kansasii* se ha perfilado como una causa importante de infección por micobacterias no tuberculosas, siendo el agente etiológico más frecuente de micobacteriosis pulmonar no tuberculosa en la zona central, mientras que en las zonas rurales del sudeste la causa más frecuente es *M. avium* complex. (Christianson & Dewlett, 1960). Así, la enfermedad presenta una alta incidencia en regiones del medio y bajo oeste de Estados Unidos. En el estudio realizado por Bloch *et al.* (1998) en el norte de California, se estima una incidencia de 2,4 casos/ 10⁵ adultos/año entre la población general, de 115 casos/ 10⁵ pacientes VIH +/- año y de 647 casos/ 10⁵ pacientes con SIDA/ año. Esta incidencia es mucho más elevada que las referidas en épocas anteriores, como la determinada durante los años 1982-1983 por el laboratorio de vigilancia nacional, que estimó una prevalencia de 0,3 casos /10⁵ habitantes.

En el Reino Unido, este organismo es la causa más frecuente de infección pulmonar por micobacterias no tuberculosas en población no VIH (Evans *et al.*, 1996b). Los pacientes VIH constituyen una población de mayor riesgo por la severa inmunosupresión, que actúa como factor predisponente para la diseminación del proceso (Sherer *et al.*, 1986; Horsburgh & Selik, 1989). *M. kansasii* es una causa frecuente, tras *M. avium* complex, de enfermedad pulmonar y/o diseminada en pacientes con SIDA. Sin embargo, Yates *et al.* (1993) en un estudio realizado en el sudeste de Inglaterra no observaron un incremento significativo del número de infecciones causadas por *M. kansasii* desde el comienzo de la epidemia de SIDA, lo que enfatiza el posible papel de la distribución geográfica en la epidemiología de la infección por *M. kansasii*.



Figura 1.2.- Distribución de los casos (Alcaide *et al.*, 2006).

En España, según Hernández *et al.* (1990), este microorganismo es la causa más frecuente de infección pulmonar por micobacterias no tuberculosas. Afecta a pacientes de mayor edad que *M. tuberculosis*, con enfermedades sistémicas o pulmonares crónicas de base, siendo capaz de producir enfermedad diseminada en pacientes con alteración de la inmunidad celular, como los tratados con glucocorticoides e inmunosupresores,

trasplantados, pacientes con enfermedades autoinmunes y hematológicas, y pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Castro *et al.*, 1998).

Alcaide *et al.* (2006), refieren que se aísla con más frecuencia en las zonas más densamente pobladas (Figura 1.2). De modo que en el sexenio 2000-2005, las comunidades con mayor número de casos registrados fueron Cataluña (32,4%), Euskadi (29%), la Comunidad Valenciana (9,1%) y la Comunidad de Madrid (7,4%) (Tabla 1.6).

Tabla 1.6.- Frecuencia de aislamiento de *M. kansasii* en las diferentes Comunidades Autónomas de España (Jiménez-Pajares *et al.*, 2005; Alcaide *et al.*, 2006).

Comunidad	Jiménez-Pajares <i>et al.</i> *	Alcaide <i>et al.</i> *	Comunidad	Jiménez-Pajares <i>et al.</i> *	Alcaide <i>et al.</i> *
Andalucía	2,7	3,0	Galicia	3,4	0,5
Aragón	-	7,2	Euskadi	21,8	29,0
Asturias	12,1	5,3	Extremadura	1,3	0,3
Canarias	-	0,8	La Rioja	0,3	-
Cantabria	1,7	1,0	Madrid	28,5	7,4
Castilla y León	7,0	1,8	Murcia	2,0	0,2
Castilla – La Mancha	0,7	0,1	Navarra	1,0	1,7
Cataluña	10,7	32,4	Principado de Asturias	12,1	-
Comunidad Valenciana	6,7	9,1	*: porcentaje sobre el total de aislados identificados		

Estos datos son similares a los descritos por Jiménez-Pajares *et al.* (2005), quienes señalan que las comunidades con mayor porcentaje de aislados son aquellas que tienen una actividad industrial mayor y la población se agrupa en grandes zonas urbanas (Tabla 1.6). Sin embargo, entre ambos estudios existe un sesgo evidente: el de Alcaide *et al.* (2006) se basa en los resultados de un estudio multicéntrico retrospectivo-prospectivo en el que participan 92 hospitales, mientras que en el de Jiménez-Pajares *et al.* (2005) se describen los resultados obtenidos con los aislados remitidos al Centro

Nacional de Microbiología durante el cuatrienio 2000-2003. En la Comunidad Valenciana, en el área de influencia del Hospital Clínico Universitario de Valencia, *M. kansasii* es la segunda especie más prevalente (6,6%), tras *M. tuberculosis* (Fraile *et al.*, 2006). Martínez Moragón *et al.* (2001), en un estudio realizado sobre pacientes del área de Hospital Universitario La Fe de Valencia, describen que *M. kansasii* es la micobacteria no tuberculosa más prevalente (54,0%), seguida de *Mycobacterium avium* complex (40%), aunque en los pacientes VIH positivos predomina *M. avium* complex (61%) y en los no VIH predomina *M. kansasii*, con un 76,0%.

Alcaide *et al.* (2006), señalan que el aislamiento de *M. kansasii* es más común en los hombres que en las mujeres (78,1% frente al 21,9% de los casos), que la edad media de los pacientes es de 54 años y la proporción de individuos portadores de anticuerpos frente a VIH es del 12,4%, de los cuales el 73% reúnen criterios de enfermedad por *M. kansasii*, frente al 77,6% del resto de la población. Leal *et al.* (2005), refieren que la edad media de los pacientes infectados por este organismo es de 53,01 años para los hombres y de 48,2 años para las mujeres, con una mayor prevalencia entre los 50-60 años y los 30-40 años, respectivamente; además, hallan que el proceso es más frecuente entre hombres (84,1%), en los pacientes sin infección por VIH (83,6%), y que las enfermedades de base más frecuentes son EPOC (25,9%), tuberculosis (20,5%), hepatopatía crónica (11,4%), úlcera duodenal (8,6%), cáncer de pulmón (7,7%), infección por VIH (7,3%) y otros procesos neoplásicos (6,8%).

Los estudios realizados en nuestro país sobre la incidencia de la infección por *M. kansasii* demuestran la existencia de diferencias poblacionales y loco-regionales importantes. En Elche, Rodríguez *et al.*, (2003) señalan que si bien la incidencia global es baja (0,27 casos/100.000 habitantes/año), este parámetro entre los pacientes VIH asciende a 75,1 casos/100.000 habitantes/año; mientras que en el área metropolitana de Bilbao, Leal *et al.* (2005) hallan incidencias que varían entre los 2,05 casos/100.000 habitantes/año, del Área

de Salud de Uribe, y los 8,05 casos/100.000 habitantes/año, del Área de Salud de Margen Izquierda-Encartaciones.

1.3.3 Epidemiología molecular.

El primer método de tipificación desarrollado para *M. kansasii* fue la fagotipia (Engel & Berwald, 1980a). Sin embargo, la laboriosidad y las dificultades de la técnica, unido a la dificultad de interpretación de los resultados y su baja reproductibilidad, determinaron que dicho método no fuera ampliamente utilizado.

En los últimos años, diferentes métodos de tipificación molecular basados en el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción, obtenidos mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Alcaide *et al.*, 1997; Inuma *et al.*, 1997; Picardeau *et al.*, 1997) y tras electroforesis previa amplificación específica (AFLP) (Picardeau *et al.*, 1997; Gaafar *et al.*, 2003) o aleatoria (RAPD) (Alcaide *et al.*, 1997), han sido utilizados como herramientas epidemiológicas.

La electroforesis en campo pulsante (PFGE) es una técnica ampliamente utilizada para tipificar diferentes microorganismos en brotes epidemiológicos y estudios poblacionales. Sin embargo, en el caso de las micobacterias, la especial composición de su pared celular y motivos de bioseguridad, han hecho que el desarrollo de protocolos normalizados sea especialmente complejo y que los resultados obtenidos sean difíciles de reproducir (Singh *et al.*, 1999). La ausencia de protocolos que permitan generar, almacenar y comparar patrones PFGE, ha limitado su uso en estudios de epidemiología molecular sobre micobacterias (Singh *et al.*, 1999). En este sentido, los trabajos realizados por diversos investigadores han aportado datos contradictorios en cuanto a la capacidad del método para determinar la diversidad genética de aislados de un mismo genotipo y su utilidad en la epidemiología molecular. En el caso de *M. kansasii*, Picardeau *et al.* (1997) mediante PFGE, refieren la obtención de cuatro patrones entre las 24 cepas del subtipo I que estudiaron con la endonucleasa *DraI*. Por otra parte, Alcaide *et al.*

(1997) hallan una aparente clonalidad entre los aislados de la subespecie I, que relacionan con el insuficiente poder discriminatorio de la técnica. Sin embargo, Linuma *et al.*, (1997), describen la existencia de diversos patrones PFGE entre los aislados de *M. kansasii* estudiados, concluyendo que se trata de una técnica con gran capacidad de tipificación, reproducible y alto poder discriminatorio.

La técnica AFLP es un método con muy buenas expectativas como técnica de tipificación bacteriana (Huys *et al.*, 2000). Es un método prometedor, novedoso y que combina la aplicabilidad universal con alto poder de discriminación y reproductibilidad (Janssen *et al.*, 1996). Clásicamente, se basa en la ligación de adaptadores a fragmentos de restricción selectivos y posterior amplificación de los mismos mediante PCR con iniciadores específicos que se unen a dichos adaptadores (Salvelkoul *et al.*, 1999). Para ello se requiere una pequeña cantidad de DNA genómico purificado (10-100 ng) que es digerido con dos enzimas de restricción y los adaptadores de doble cadena se ligan a los fragmentos de restricción obtenidos. Posteriormente, se realiza una amplificación mediante PCR con iniciadores marcados radiactivamente, y los productos de tal amplificación son separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995). Debido a los problemas derivados del uso de iniciadores marcados radiactivamente, también se han desarrollado iniciadores fluorescentes que permiten la detección de los fragmentos en aparatos de secuenciación automática. Existen muchas variantes de esta técnica. Una de ellas, se basa en el uso de un solo enzima de restricción, un solo adaptador y el empleo de iniciadores no marcados junto con electroforesis en geles de agarosa (Valsangiacomo *et al.*, 1995). Esta forma simplificada presenta diversas ventajas sobre la forma clásica, ya que permite la detección de patrones polimórficos, sin necesidad de usar iniciadores marcados y sin tener que usar geles de poliacrilamida. Los resultados obtenidos mediante el análisis AFLP con el enzima de restricción *Pst*I con respecto a la diferenciación de cepas dentro de cada uno de los cinco subtipos de *M. kansasii*, mostraron que los patrones dentro del subtipo I eran muy similares o incluso idénticos y sólo unas pocas cepas, presentaban patrones diferentes del compartido por la

mayoría de ellas (Picardeau *et al.*, 1997). Si embargo, Gaafar *et al.* (2003), logran describir 12 *clusters* diferentes entre los aislados del subtipo I utilizando, según Valsangiacomo *et al.* (1995), un solo enzima de restricción (*Apal*) que teóricamente corta el genoma de microorganismos con alto contenido en guanina+citosina, como es el caso de *M. kansasii* (G+C del 64%) con una frecuencia media de corte (Janssen *et al.*, 1996), un solo adaptador e iniciadores no marcados.

1.4 Patogénesis.

1.4.1 Determinantes de patogenicidad.

M. kansasii es una de las principales micobacterias no tuberculosas causante de enfermedad pulmonar en pacientes inmunocompetentes y de enfermedad pulmonar, extrapulmonar y diseminada en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los factores de virulencia y de los mecanismos de patogenicidad de *M. kansasii* para invadir y sobrevivir en el huésped infectado. Las similitudes clínico-epidemiológicas (Evans *et al.*, 1996a; Evans *et al.*, 1996b) y las relaciones filogenéticas (Roth *et al.*, 1998) existentes entre este organismo y *M. tuberculosis*, sugieren la posible existencia de mecanismos patogénicos similares y que ambas especies podrían expresar factores de virulencia relacionados (Arend *et al.*, 2005).

Las micobacterias tienen una serie de propiedades biológicas que determinan sus características ecológicas, epidemiológicas y patogénicas. La peculiar velocidad de crecimiento de estos organismos guarda relación con el número de cistrones de rRNA 16S que presentan, de modo que las especies de crecimiento lento tienen un único cistrón, frente a los dos que comúnmente tienen las especies de crecimiento rápido; este hecho facilita la aparición de resistencias mutacionales frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis proteica y, en el caso de aquellas micobacterias que reconocen un reservorio medioambiental, su adaptación a condiciones adversas del ecosistema (Pimm *et al.*, 2004).

Como ha sido señalado, es en la pared celular de las micobacterias donde se localizan los factores de patogenicidad, virulencia e interacción molecular con las células del hospedador (Rastogi & Barrow, 1994). La envoltura celular de las micobacterias es una estructura compleja, con gran riqueza lipídica (Rastogi & Barrow, 1994), y en ella se localizan los antígenos que permiten la interacción con las células del hospedador (Wiker & Harboe, 1992; Naito *et al.*, 2005).

Los lípidos parietales tornan impermeable la célula bacteriana, hecho que determina su resistencia innata a numerosos antibióticos y biocidas, incluido el cloro, y facilita la supervivencia intracelular en las amebas de vida libre y en las células animales de estirpe fagocitaria. Por otro lado, en el caso de las micobacterias ambientales de reservorio acuático, la hidrofobicidad celular debida a los lípidos parietales, determina entre otros hechos, su fijación a las superficies de materiales y celulares, que facilita: i) la formación de biofilms y los mecanismos de fagocitosis; ii) su concentración en la interfase agua-aire y su rápida aerosolización (Primm *et al.*, 2004).

Las micobacterias, entre ellas *M. kansasii*, presentan a nivel parietal un antígeno proteico denominado “complejo antigénico 85” (Ag 85), que es secretado al medio (Wiker & Harboe, 1992; Naito *et al.*, 2005). Este antígeno, tiene actividad micoliltransferasa, interviene en la biosíntesis de la pared micobacteriana (Belisle *et al.*, 1997) y está conformado por tres componentes estructuralmente relacionados (Ag 85A, Ag 85B, Ag 85C), de los cuales el mejor conocido es el Ag 85B. Además, tiene afinidad por la fibronectina, lo que facilita la fijación de las micobacterias sobre las superficies celulares recubiertas por esta proteína y su penetración en las células del hospedador (Thole *et al.*, 1992). En el caso de *M. tuberculosis*, el Ag 85 es considerado como el antígeno inmunodominante, es decir, aquél que produce una mayor estimulación de las ramas efectoras celular y humoral del sistema inmunitario, el que induce la síntesis de INF- γ (Huygen *et al.*, 1988; Valle *et al.*, 2001) y provoca una inmunidad protectora frente a la infección por este microorganismo (Andersen, 1994). Pero este antígeno, según señala Godfrey *et al.* (1992)

podría modular negativamente el establecimiento y la expresión *in vivo* de la hipersensibilidad retardada, ya que podría unirse e inactivar la fibronectina sintetizada por las células T sensibilizadas, que se asocia al desarrollo de dicha reacción inflamatoria, y generar un estado anérgico frente a antígenos micobacterianos.

Recientemente, Naito *et al.* (2005) han demostrado que el Ag 85B de *M. kansasii* presenta dos epítomos ligadores de fibronectina, altamente conservados en otras micobacterias, de los cuales el conformado por los aminoácidos 84 a 110, según demuestran los ensayos de inhibición, estaría localizado en la superficie parietal lo que facilitaría la interacción bacteria-célula. Siemion & Wieczorek (2003), observaron que péptidos antiadhesivos derivados de la fibronectina y del antígeno leucocitario humano DQ (HLA-DQ) son potentes inhibidores de la fagocitosis de *M. kansasii*.

Otro componente parietal son los lipomananos (LM) y lipoarabinomananos (LAM), glucolípidos complejos restringidos al género *Mycobacterium*, conocidos en el caso de *M. kansasii* como KanLM y KanLAM, respectivamente (Guéraldel *et al.*, 2003). De ellos, los mejor estudiados son los LAM, que actúan como importantes factores de virulencia para muchas micobacterias, ya que facilitan los mecanismos de interacción entre éstas y las células de estirpe fagocitaria, y modulan la respuesta del hospedador inhibiendo inespecíficamente la activación de los linfocitos, la presentación de antígenos y la activación de los macrófagos, entre otras actividades (McNeil & Brennan, 1991). Atendiendo a la cadena terminal hidrocarbonada asociada al dominio arabinano, han sido descritos tres tipos de LAM: ManLAM (manosil-LAM), detectado en *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *Mycobacterium leprae* y *M. kansasii*, entre otros; PILAM (fosfatidil-inostol-LAM) presente en las micobacterias no patógenas, *vgr. Mycobacterium smegmatis*; AraLAM (arabinosil-LAM) característico de *Mycobacterium chelonae*.

Astarie-Dequeker *et al.* (1999), señalan que los residuos manosil de ManLM y ManLAM serían los ligandos que reconocerían los receptores manosil-manosa de los macrófagos humanos, y que su interacción permitiría la

internalización de las micobacterias y prevendría la fusión fagolisosomal en condiciones no opsónicas. Por otro lado, Le Cabec *et al.* (2000) y Peyron *et al.* (2000) refieren que los receptores CR3 de los macrófagos y neutrófilos son una puerta segura para la internalización de las micobacterias, incluido *M. kansasii*, en condiciones no opsónicas, dado que su actividad lectinoide con afinidad por los residuos manosil-manosa existentes en la pared micobacteriana permitiría la internalización y multiplicación intracelular.

Existen evidencias que sugieren que la evasión de la apoptosis de los macrófagos inducida por la infección de micobacterias patógenas representa un mecanismo de escape de las defensas del hospedador, ya que permite la creación de un ambiente favorable para su desarrollo intracelular. Este fenómeno guarda relación con el tipo de LAM existente en la pared celular, ya que su comportamiento como moléculas anti-inflamatorias o pro-inflamatorias viene dado por la presencia de residuos manosil (ManLAM) o fosfatidil-inositol (PILAM), respectivamente. De modo que ManLAM como consecuencia de la inhibición de la activación de los macrófagos y de la síntesis de TNF- α y del IL-12, inhibiría la muerte celular programada facilitando la multiplicación y la supervivencia intracelular de las micobacterias; mientras que el carácter pro-inflamatorio de PILAM induciría la activación macrofágica y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias que conducirían a la muerte intracelular.

Guerardel *et al.* (2003), en un estudio sobre las características estructurales y las actividades biológicas del LAM obtenido de aislados clínicos de *M. kansasii* (KanLAM), y su precursor el LM (KanLM), demostraron la singularidad de ambos lipoglicanos, y el carácter anti-inflamatorio y pro-inflamatorio de KanLAM y KanLM, respectivamente. Hecho este último, corroborado por Vignal *et al.* (2003) quienes demuestran que: i) KanLM estimula la expresión de mRNA y la síntesis de TNF- α y de IL-8 a partir de macrófagos humanos mediante su interacción con los receptores macrofágicos CD14 y TLR-2, y que el dominio manano es esencial para esta función; ii) la estimulación celular depende de la presencia de la proteína fijadora de

lipopolisacáridos (LPS-bp), responsable de la transferencia de glucolípidos a los CD14. Por otro lado, señalan que el dominio arabinano de KanLAM previene la interacción de esta molécula con CD14 y TLR-2, ya que la degradación de dicho dominio restaura la producción de citocinas. De modo que KanLM facilitaría la respuesta inflamatoria innata, mientras que KanLAM tendría un efecto antagónico.

Por otro lado, el hecho de que los aislados de origen humano pertenezcan mayoritariamente al genotipo I (Ross *et al.*, 1992; Alcaide *et al.*, 1997; Picardeau *et al.*, 1997), podría reflejar la existencia de diferencias genéticas relacionadas con la virulencia entre este genotipo y los aislados medioambientales (Arend *et al.*, 2005).

A este respecto, Arend *et al.* (2005) en un estudio sobre la presencia en aislados clínicos y ambientales de *M. kansasii* de los genes *esat-6* y *cfp-10*, presentes en la región RD1 de los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, y sobre la síntesis de sus productos transcripcionales, las proteínas ESAT-6 y CFP-10, demostraron que todos los aislados presentaban ambos genes y que todos ellos sintetizaban las proteínas ESAT-6 y CFP-10, aunque su concentración estaba relacionada con el genotipo. De modo que los genotipos I y II, producían cantidades equimoleculares de ambas proteínas, tal como sucede con *M. tuberculosis* y *M. bovis*, mientras que en los restantes genotipos incluidos en el estudio (III a V), la cuantía de ESAT-6 frente a CFP-10 era 3:1. Todo lo cuál, les llevó a postular que los genotipos III a V deberían ser considerados como no patógenos, dado que al no existir concentraciones intracitoplasmáticas 1:1 de ambas proteínas, ESAT-6 no podría ser secretada y por lo tanto no produciría la citolisis de los neumocitos, como ocurre con *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

1.4.2 Factores dependientes del hospedador.

Los factores de riesgo para la infección por *M. kansasii* incluyen la existencia de enfermedades pulmonares subyacentes, entre las que cabe destacar las alteraciones de la función ventilatoria (Ahn *et al.*, 1976), la

neumoconiosis (Jenkins, 1981), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Gorse *et al.*, 1983; Maliwan & Zvetina, 2005), y la fibrosis quística (Wolinsky, 1979; Forslow *et al.*, 2003), así como, el cáncer (Jacobson *et al.*, 2000) y el alcoholismo (Maliwan & Zvetina, 2005). Por otro lado, la exposición continua que sufren las personas que trabajan en lugares en los que se genera polvo, tales como explotaciones de carbón, industria del acero y del vidrio es también considerada un factor de riesgo para la infección por *M. kansasii* (Marks, 1975, Falkinham, 1996).

Lógicamente una situación de inmunodeficiencia es también un factor de riesgo para la infección por *M. kansasii*. Según Levine & Chaisson (1991) dicha situación y los bajos recuentos de linfocitos T CD4 parecen predisponer a que los pacientes sufran una diseminación de la infección.

Wiedland *et al.* (2006) realizaron un estudio en modelo murino con ratones deficitarios en CD4. Aunque éstos presentaban una mayor susceptibilidad a padecer infecciones por *M. tuberculosis*, no presentaban mayor predisposición a padecer infecciones por *M. kansasii* si se comparaban con el grupo de ratones control. El estudio reveló finalmente que la respuesta inmune protectora frente a la infección por *M. kansasii* no depende de la presencia de linfocitos T CD4 o de la producción de IFN- γ . Esto hacía pensar que la infección por *M. kansasii* se producía en casos de complejas inmunodeficiencias, de modo que las células T CD4, el IFN- γ y las células T helper (respuesta celular tipo 1) jugaban un papel limitado en la inmunidad protectora frente a la infección pulmonar por *M. kansasii*.

1.4.3 Colonización frente a Infección.

M. kansasii raramente coloniza. Lillo *et al.* (1990) encontraron una proporción de enfermedad / colonización de 10:1, por lo que su aislamiento en número significativo de colonias es sinónimo de enfermedad.

Para poder diferenciar colonización, contaminación y enfermedad pulmonar se siguen los criterios de la American Thoracic Society (Anonymous,

1990): i) cuadro clínico radiográfico compatible con tuberculosis pulmonar activa; ii) aislamiento en cultivo de múltiples colonias de la misma especie de micobacteria en dos o más esputos, o en esputo y broncoaspirado; iii) exclusión de otras posibles causas de enfermedad.

No obstante, en los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo en relación con la infección por VIH, muchos autores cuestionan tales criterios (Sancho y Carrión, 2002). La presencia de micobacterias oportunistas en secreciones respiratorias de pacientes VIH positivos, presenta un particular problema, ya que estos pacientes están frecuentemente infectados por micobacterias no tuberculosas sin evidencia de enfermedad pulmonar. Esta infección puede ser pasajera o reflejar una enfermedad diseminada o una afectación pulmonar subclínica (Wallace *et al.*, 1997).

1.5 Manifestaciones clínicas.

M. kansasii es, tras *M. avium* complex la micobacteria oportunista que con mayor frecuencia ha sido relacionada con la producción de enfermedad, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos, afectados o no de SIDA (Choudhri *et al.*, 1995). Aunque la forma más frecuente de presentación es la forma pulmonar, también puede causar otras infecciones localizadas, así como infecciones sistémicas (Wallace *et al.*, 1997).

1.5.1 Infecciones localizadas.

1.5.1.1 Enfermedad pulmonar.

La enfermedad pulmonar es la forma más frecuente de manifestación clínica de infección localizada por *M. kansasii*. En EEUU, esta micobacteria es la segunda micobacteria no tuberculosa, tras *M. avium* complex, que más frecuentemente causa enfermedad pulmonar. Se da en determinadas áreas geográficas y afecta principalmente a varones adultos de raza blanca, aunque puede afectar a pacientes de cualquier sexo, raza o edad; algunos de ellos con enfermedades pulmonares crónicas subyacentes, aunque la proporción de individuos con enfermedades de base es menor que en el caso de la

enfermedad pulmonar por *M. avium* complex. Los niños raramente desarrollan esta forma de presentación, salvo aquellos afectados de fibrosis quística (Wolinsky, 1979). Forslow *et al.* (2003), describen en su trabajo que el 6,1% de los pacientes con fibrosis quística están infectados por micobacterias no tuberculosas, de los cuales el 9,1% corresponde a pacientes con cultivos positivos para *M. kansasii*.

Clínicamente la infección pulmonar es insidiosa, de características similares a la producida por *M. tuberculosis*, con malestar general, astenia, fiebre, tos productiva, disnea, hemoptisis y pérdida de peso; es decir, unos signos y síntomas bastante inespecíficos, que incluso se pueden solapar con los de la enfermedad pulmonar subyacente. Ocasionalmente este organismo puede causar enfermedad neumónica o nódulo pulmonar solitario sin cavitación. La afectación basal de la pleura no se produce con frecuencia y el derrame pleural es raro (Evans *et al.*, 1996a, 1996b).

El estudio radiográfico de tórax puede mostrar imágenes variadas, que contrastan con el patrón típico de la enfermedad pulmonar por *M. tuberculosis*. Son muy frecuentes las lesiones cavitadas en lóbulos superiores (Gallont & Ko, 1996), que se observan en el 43 a 96% de los casos según las series (León *et al.*, 1994). Evans *et al.* (1996a), en un estudio comparativo sobre los hallazgos radiográficos observados en pacientes con infección pulmonar por *M. tuberculosis* y *M. kansasii*, refieren que: i) en la infección por *M. kansasii* las alteraciones son comúnmente unilaterales y se localizan preferentemente en los lóbulos superiores, mientras que en el caso de infección por *M. tuberculosis* las lesiones se localizan generalmente en lóbulos inferiores; ii) la afectación de más de un segmento pulmonar, la presencia de broncograma aéreo y de derrame pleural es menos frecuente en el caso de infección por *M. kansasii*, que en la debida a *M. tuberculosis*; iii) la proporción de pacientes con lesiones cavitadas es similar en ambos grupos, aunque en el caso de infecciones asociadas a *M. kansasii* las lesiones son de menor diámetro. A pesar de ello, señalan que las diferencias detectadas no son suficientes para establecer el diagnóstico diferencial, aunque determinados

signos, como la presencia de derrame pleural o la afectación de lóbulos inferiores, hacen improbable la implicación etiológica de *M. kansasii*.

1.5.1.2 Linfadenitis.

Es la forma más frecuente de presentación de la enfermedad por micobacterias no tuberculosas en niños, y en ausencia de infección por VIH raramente se da en adultos (Wolinsky, 1995). Este proceso afecta a niños entre los 2 y 4 años de edad, siendo raro a partir de los 10 años. En ocasiones se describen como antecedentes la infección gingival, un traumatismo bucal o una erupción dentaria previa, pudiéndose contraer la infección por la ingesta de agua, tierra o alimentos contaminados. Suele afectar a ganglios de las cadenas cervicales anteriores y submaxilares, y con menos frecuencia a los de áreas preauriculares. Suele tener un curso crónico e insidioso con tendencia a la fistulización y cicatrización. En la literatura médica española, entre 1990 y 2004, se recogen 23 casos de linfadenitis sobre un total de 35 casos de infecciones en niños producidas por micobacterias oportunistas (Baquero-Artigao, 2005).

En las series revisadas, *M. kansasii* ocupa el tercer lugar, con frecuencias que varían entre el 1,8% (Flint *et al.*, 2000) y el 5% (Albright & Pransky, 2003), tras *M. avium* complex (70-98,2%) y *Mycobacterium scrofulaceum* (10-20%) (Flint *et al.*, 2000; Albright & Pransky, 2003).

1.5.1.3 Otros procesos infecciosos.

Se ha descrito la implicación de *M. kansasii* en procesos tan diversos como meningitis (Bergen *et al.*, 1993; Flor *et al.*, 1996), sinovitis y tenosinovitis (Zenone *et al.*, 1999), artritis (Carroll *et al.*, 1984; Bernard *et al.*, 1999), osteomielitis (Yano *et al.*, 2004), síndrome del túnel carpiano (Blue *et al.*, 2002), infección hepática y esplénica (Cook & Christie, 1999), lesiones cutáneas e infecciones de tejido celular subcutáneo (Mayberry *et al.*, 1965; Chaves *et al.*, 2001) y afectación del sistema musculoesquelético (Barham & Hargreaves, 2006).

También se ha descrito la posible implicación de *M. kansasii* en infecciones osteoarticulares generadas tras inoculación directa por traumatismo accidental, incisión quirúrgica, heridas punzantes o inyecciones (Wolinsky, 1979; Falkinham, 1996).

Las infecciones cutáneas por *M. kansasii* son muy raras (Chaves *et al.*, 2001); la primera de ellas fue descrita en 1965 (Mayberry *et al.*, 1965) y desde entonces se han recogido en la bibliografía casi 50 casos. Los pacientes tenían edades comprendidas entre 16 y 84 años. En el 72% de los casos existían alteraciones inmunológicas de base (quimioterapia, trasplante renal o cardíaco, enfermedades inmunes o SIDA) u otros factores predisponentes (Breathnach *et al.*, 1995), y en el 28% se trataba de pacientes inmunocompetentes por inoculación exógena tras pequeña lesión traumática, demostrada en dos tercios de los casos (Nadal *et al.*, 1997). Breathnach *et al.* (1995) señalan que los factores de riesgo para la infección cutánea por *M. kansasii*, incluyen enfermedad sistémica, inmunosupresión, patología cutánea y la exposición a aguas contaminadas.

La afectación cutánea puede presentarse en forma de pápulas, nódulos, pústulas, úlceras costrosas, verrugas, abscesos, celulitis y úlceras orales o perianales. Chaves *et al.* (2001) describen el caso de una infección cutánea en una niña de seis años de edad no inmunodeprimida. Se pensaba que la vía de entrada, dado que la lesión apareció en verano, pudo ser un pequeño traumatismo en la piscina. La niña presentaba lesiones nodulares eritematosas y de aspecto costroso en el codo izquierdo, sin afectación del estado general, linfadenitis ni hepatoesplenomegalia. La lesión no respondió a la terapia inicial con amoxicilina y cloxacilina. La tinción de Ziehl-Neelsen de la biopsia cutánea reveló la presencia de BAAR. La exéresis quirúrgica se completó con cinco meses de tratamiento con eritromicina sin recurrencias de la lesión.

Bartralot *et al.* (2000), en un estudio comparativo, refieren que la presencia de un patrón bifásico con microabscesos polimorfonucleares en dermis y tejido celular subcutáneo, así como la formación de granulomas

epiteloides con o sin necrosis, debería indicar la posibilidad de una infección por micobacterias no tuberculosas. Además, la duración de la infección y el estado inmunológico del hospedador son los dos parámetros fundamentales que conducen a la variabilidad de las manifestaciones clínicas e histopatológicas observadas en las infecciones cutáneas por micobacterias no tuberculosas.

1.5.1.4 Infecciones en pacientes con neoplasias.

Los pacientes con cáncer, particularmente los pacientes con leucemia, muestran un mayor riesgo que la población general para desarrollar infecciones por *M. kansasii*, sin mostrar la clínica típica de una infección micobacteriana, a pesar de presentar una afectación radiográfica extensa e importante. Jacobson *et al.* (2000), en un estudio retrospectivo sobre la incidencia de este microorganismo demuestran que es una causa infrecuente (25 casos/100.000 pacientes registrados) pero importante de enfermedad en pacientes con neoplasias, sobre todo de edad avanzada. Las manifestaciones de la infección en estos pacientes son variadas y van desde formas diseminadas (8%) a simples colonizaciones (20%), pasando por formas pulmonares ciertas (40%), probables (12%) y posibles (20%).

Aunque las infecciones por *M. kansasii* en la población general se presentan típicamente como una enfermedad pulmonar cavitada que afecta a lóbulos superiores y que evoca una tuberculosis, la mitad de los pacientes con cáncer presentan infiltrados multilobares sin cavitación (Ahn *et al.*, 1982; Lillo *et al.*, 1990). De modo que en estos pacientes, debido a la trascendencia clínica de una infección por micobacterias, es importante mantener la sospecha diagnóstica ante la aparición de nuevos infiltrados pulmonares con o sin signos clínicos de enfermedad.

Un caso especial lo constituye la asociación de tuberculosis pulmonar y carcinoma de pulmón que es bien conocida en la literatura desde hace años. La incidencia de carcinoma broncogénico es mayor en los pacientes con tuberculosis que en la población general, lo que puede deberse a

varias razones: i) las zonas cicatriciales parenquimatosas presentan mayor predisposición a desarrollar neoplasias, sobre todo adenocarcinomas; ii) la tuberculosis puede reactivarse por la erosión de los focos caseosos encapsulados, debido a la infiltración de células neoplásicas (Tomás *et al.*, 1990); iii) la infección o reactivación puede estar favorecida por la inmunosupresión celular relacionada con la propia neoplasia, los procedimientos radio-quimioterápicos, o con la caquexia y malnutrición que conllevan las enfermedades malignas (Feld *et al.*, 1976).

El carcinoma broncogénico puede desarrollarse sobre procesos cicatriciales secundarios a lesiones tuberculosas o bien aparecer sincrónicamente (Fernández de Sevilla *et al.*, 1988), pero la presentación simultánea de ambos procesos es poco frecuente, ocurriendo en el 1 a 3% de los pacientes con cáncer de pulmón según las series (Martínez *et al.*, 1995), resultando excepcional la presentación sincrónica de infección pulmonar por micobacterias atípicas y el carcinoma broncopulmonar. Zvetina *et al.*, (1992), describen las primeras observaciones de infección pulmonar por *M. kansasii* en pacientes que habían sido tratados de neoplasias pulmonares y señalan que este organismo debe ser considerado en pacientes procedentes de áreas endémicas, especialmente en aquellos que hayan recibido tratamiento radioterápico.

En el caso presentado por Sancho y Carrión (2002), la presencia de carcinoma epidermoide metastásico junto con imágenes cavitadas en la radiografía de tórax y aislamiento de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo, hizo pensar inicialmente en la reactivación de un proceso tuberculoso antiguo en un paciente con carcinoma broncogénico, si bien la identificación de *M. kansasii* a partir de los cultivos obligó a replantearse la situación. Se han descrito otros casos de infección pulmonar por *M. kansasii* y carcinoma broncogénico sincrónico: Lillo *et al.* (1990) refieren que el 13,6% de los pacientes con cultivos positivos para *M. kansasii*, presentaban carcinoma broncogénico; Echevarría *et al.* (1994) describen que el 7,4% de los pacientes con infección por *M. kansasii*, presentaban una neoplasia, sin especificar el

origen. Las causas por las que ambos procesos aparecen sincrónicamente serían las mismas que las descritas para la tuberculosis pulmonar, jugando un papel fundamental, la alteración del aclaramiento mucociliar y de la función de los macrófagos (Zvetina *et al.*, 1992).

1.5.2 Enfermedad diseminada.

La infección diseminada por *M. kansasii* es un proceso raro, asociado comúnmente a estados de inmunodepresión, relacionados o no con la infección por VIH. No obstante, existen descripciones en pacientes inmunocompetentes como las realizadas por Suzuki *et al.* (2005) y Tsai *et al.* (2006) quienes refieren sendos casos, uno con afectación pulmonar y de la médula ósea en un paciente con síndrome del intestino corto, y otro con afectación multiorgánica en un paciente sin enfermedad de base, respectivamente.

En los pacientes no VIH, este proceso ha sido descrito tanto en pacientes con inmunodepresión secundaria a la enfermedad de base como de origen iatrogénico por tratamiento con corticoides, citostáticos y radiaciones ionizantes (Lichtenstein & MacGregor, 1983). Normalmente, se presenta como múltiples nódulos subcutáneos o abscesos que drenan espontáneamente, mientras que la infección por *M. avium* complex, que es el agente más frecuente, se suele manifestar por un cuadro de fiebre de origen desconocido. La mortalidad de este tipo de infección se correlaciona directamente con el tipo y severidad de la enfermedad subyacente (Wolinsky, 1979).

En los pacientes VIH, la infección diseminada se da en estadios avanzados de la enfermedad con recuentos de CD4 <100 células/ μ L y criterios diagnósticos de SIDA. Generalmente, la infección se produce por vía hematogena a partir de un foco pulmonar, y se acompaña de fiebre, astenia, pérdida de peso, sudoración nocturna, adenopatías generalizadas, a veces dolor abdominal y diarrea, así como, manifestaciones relacionadas con el órgano afecto. Estos hallazgos pueden confundirse con signos de enfermedad avanzada debidos a la propia infección por el VIH, aunque las adenopatías retroperitoneales o abdominales y la hepato-esplenomegalia pueden estar

presentes. La anemia es la alteración de laboratorio más frecuente. Comúnmente la infección diseminada se asocia a enfermedad pulmonar (Sherer *et al.*, 1986; Horsburgh & Selik, 1989), y según señalan Sherer *et al.* (1986) la mayoría de los casos descritos en la literatura han sido de evolución fatal.

La mortalidad asociada a la infección por *M. kansasii* depende evidentemente de varios factores, que incluyen además de la extensión de la infección, el estado de inmunosupresión del paciente, la presencia concomitante de otras enfermedades, y el adecuado cumplimiento del tratamiento. En un estudio realizado en Estados Unidos sobre 302 pacientes durante un periodo comprendido entre 1952 y 1995, la mortalidad de la enfermedad causada por *M. kansasii* alcanzó el 7,9%, aunque en dicho trabajo se incluían tanto pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos (Maliwan & Zvetina, 2005).

1.6 Diagnóstico microbiológico.

El diagnóstico de las infecciones producidas por *M. kansasii*, como el de cualquier proceso infeccioso de probable etiología micobacteriana, es de tipo directo y se basa en la visualización, aislamiento en cultivo e identificación del agente causal, y en el estudio de sensibilidad a los antibióticos (Wallace *et al.*, 1997).

1.6.1 Procedimiento diagnóstico general.

Según las recomendaciones de la American Thoracic Society (Wallace *et al.*, 1997) las técnicas de tinción empleadas para el diagnóstico de la infección por *M. tuberculosis* son útiles para búsqueda de micobacterias no tuberculosas en material clínico. Para ello se pueden emplear dos métodos de tinción: uno de cribado, como la coloración con fluorocromos (auramina-rhodamina), y otro de confirmación, como la tinción de Ziehl-Neelsen. La primera de las técnicas presenta mayor sensibilidad y requiere menor tiempo de búsqueda, aunque los resultados positivos deben ser confirmados con la

tinción de Ziehl-Neelsen (Salfinger & Pfyffer, 1994). La apariencia de las micobacterias no tuberculosas al microscopio es prácticamente indistinguible de *M. tuberculosis*, aunque *M. kansasii*, como ha sido señalado, presenta una morfología singular a modo de bacilo grueso y alargado teñido irregularmente, lo que le da un típico aspecto atigrado que puede orientarnos en el diagnóstico de especie (Alcaide y Benítez, 1999).

M. kansasii es una micobacteria cultivable, de crecimiento lento, que se desarrolla tanto en medios de cultivo líquidos como sólidos. Pero la mayoría de las muestras remitidas para la investigación de micobacterias están contaminadas por la microbiota normal del hombre, hecho que determina la necesidad de tratar previamente las muestras con la finalidad de evitar el sobrecrecimiento bacteriano o fúngico durante la incubación de los cultivos.

Los métodos de descontaminación y concentración recomendados para la recuperación de *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas, son útiles para las micobacterias no tuberculosas. No obstante, hay que tener en cuenta que éstas son mucho más sensibles al NaOH, por lo que se debe tener especial cuidado y no excederse en la concentración de NaOH ni en el tiempo recomendado de tratamiento de las muestras (Wallace *et al.*, 1997). Los métodos de digestión y descontaminación que son empleados habitualmente en los laboratorios incluyen el pretratamiento de las muestras con laurilsulfato de sodio/NaOH (Tacquet *et Tison*, 1961) o N-acetil-L-cisteína / NaOH (Kent & Kubica, 1985). El procesamiento habitual con N-acetil-L-cisteína / NaOH seguido de ácido oxálico al 5% es un procedimiento que se debería considerar cuando exista la posibilidad de que las muestras estén contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa*, sobretodo en pacientes con bronquiectasias (Wallace *et al.*, 1997).

El tratamiento de las muestras de sangre con agentes líticos mejora significativamente la detección de micobacterias en sangre, para lo cuál se pueden usar diferentes métodos: i) hemólisis con el Sistema Isolator (Wampole Laboratorios, USA) o con desoxicolato sódico; ii) inoculación directa de la muestra en los viales 13A del sistema Bactec[®] TB (Becton Dickinson, Sparks,

Maryland) o BD Bactec[®] MYCO/F-Lytic del sistema Bactec 9000 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, USA). La recuperación de micobacterias mediante estas tres técnicas es aproximadamente la misma (Salfinger & Pfyffer, 1994).

Para el aislamiento en cultivo, se deben seguir los principios considerados para *M. tuberculosis*. Los cultivos deberían ser inoculados en uno o más medios sólidos y en un medio líquido. No se recomienda el cultivo en medio sólido como único cultivo o cultivo primario, ya que suelen ser mucho más lentos. Básicamente, hay dos tipos de medios sólidos: aquellos que llevan una base de huevo y patata (Löwestein-Jensen) y los medios con una base de agar (Middlebrook 7H10 o 7H11). Estos medios son útiles para observar la morfología de las colonias y la capacidad de producir pigmentos, así como para cuantificar el número de organismos viables, con la finalidad de valorar su significación clínica y la respuesta al tratamiento (Wallace *et al.*, 1997).

Existen en el mercado diferentes medios líquidos comercializados, unos no automatizados, como el sistema bifásico agar/caldo Septi-Chek AFB System (Becton Dickinson, Sparks, Maryland) y Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) (Becton Dickinson, Sparks, Maryland); otros semiautomáticos, como el sistema radiométrico Bactec[®] TB 460 (Becton Dickinson, Sparks, Maryland), y otros automatizados no radiométricos como los sistemas ESP Culture System II (Difco Laboratorios, Detroit, MI), Bactec[®] MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, Maryland) y MB/BacT[®] (bioMérieux Inc, Durham).

Cuando se observa crecimiento en los medios empleados, o bien éste es detectado por los sistemas automatizados, lo primero que se debe realizar es una tinción por el método de Ziehl-Neelsen para confirmar que la positividad de los cultivos es debida al crecimiento de bacilos ácido-alcohol resistentes.

1.6.2 Identificación al nivel de especie.

La identificación de *M. kansasii* puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales, cromatográficos o genómicos (Alcaide y Benítez, 1999). Tradicionalmente, los pilares fundamentales en los que se ha basado la identificación de *M. kansasii*, como la de las restantes micobacterias no tuberculosas, han sido los criterios considerados en la clasificación de Runyon respecto a la velocidad de crecimiento y la pigmentación de las colonias, las características morfo-culturales y las pruebas bioquímicas convencionales. De este modo, las pruebas de acumulación de niacina y catalasa termorresistente han sido los parámetros empleados para distinguir entre *M. tuberculosis* y otras micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento. Las pruebas bioquímicas que clásicamente han caracterizado el perfil de los aislados de *M. kansasii* son la producción de catalasa, nitrato-reductasa y pirazinamidasasa, así como la capacidad de hidrolizar el Tween[®] 80 (Tabla 1.7).

La laboriosidad y lentitud de los procedimientos convencionales, y la eventual dificultad de llegar a una identificación inequívoca, han facilitado la introducción de métodos de diferenciación alternativos. Unos, como la cromatografía líquida de alta presión, que por el equipamiento necesario y la cualificación del personal son de aplicación casi exclusiva en los laboratorios de investigación y en los centros de referencia; otros, como los métodos moleculares más asequibles a los laboratorios clínicos.

Las técnicas de detección de ácidos nucleicos se han convertido en los últimos años en la herramienta más eficaz para llegar a una identificación rápida y precisa al nivel de especie. Se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación mediante PCR de un segmento de DNA y posterior análisis de los fragmentos obtenidos mediante enzimas de restricción (RFLP) (Telenti *et al.*, 1993), hibridación en fase sólida (Tortoli *et al.*, 2003) y secuenciación (Ross *et al.*, 1992). Las dianas de amplificación mejor estudiadas son el gen *hsp65* y las regiones de la subunidad del RNA ribosómico 16S, así como la amplificación de la región espaciadora 16S-23S (Roth *et al.*, 2000). Además, algunos de estos procedimientos, como las técnicas de hibridación, pueden ser

considerados de aplicación universal, ya que existen en el mercado equipos que permiten efectuar la identificación de las micobacterias más frecuentemente aisladas en casos humanos.

Tabla 1.7.- Diferenciación de las micobacterias fotocromógenas más frecuentes.

Característica	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>
Culturales					
Temperatura óptima	37°C	35°C	30°C	37°C	37°C
Tipo de colonias	S	S/SR/R	S/SR/R	S	S/R
Pigmentación	+ F (86)	+ F (96)	+ F (100)	+ F (90)	+ E/F (93)
Bioquímicas					
Acumulación de niacina	- (0)	- (4)	-/+ (21)	± (63)	- (0)
Nitratasa	- (5)	+ (99)	- (0)	- (28)	+ (100)
Catalasa 68°C	+ (95)	+ (91)	- (30)	+ (95)	+ (93)
Cat. semicuantitativa >45 mm	+ (95)	+ (93)	-	+ (93)	+ (98)
Hidrólisis del Tween 80	+ (95)	+ (99)	+ (97)	- (9)	-/+ (49)
Pirazinamidasas (4d)	-	-	+	+	+
Ureasa	- (10)	-/+ (49)	+ (83)	± (69)	+ (72)
Arilsulfatasa (3d)	- (0)	- (0)	-/+ (41)	- (0)	V
Reducción del telurito	- (20)	-/+ (31)	-/+ (39)	+ (82)	± (53)

S: colonias lisas; R: colonias rugosas; (): porcentaje de aislados positivos; E: aislado escotocromógeno; F: aislado fotocromógeno; -/+ : usualmente ausente; ±: usualmente presente; V: variable (Vincent *et al.*, 2003)

La técnica PCR-RFLP del gen *hsp65* (PRA) descrita por Telenti *et al.* (1993) es la más usada y se basa en la amplificación del gen *hsp65* y posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos obtenidos mediante digestión con dos enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*). Este método permite una identificación rápida y precisa de las 7 subespecies de *M. kansasii* (Picardeau *et al.*, 1997; Taillard *et al.*, 2003) y aunque existen otras técnicas similares (vg. PCR-RFLP del 16S-23S), ésta es la mejor desarrollada, permitiendo la identificación a nivel de especie y genotipo en una sola jornada laboral.

La técnica de hibridación más ampliamente extendida es sin duda la que utiliza sondas de DNA quimioluminiscente (AccuProbe[®]). Se basa en la capacidad de las cadenas de ácidos nucleicos complementarios para alinearse específicamente y asociarse a complejos de doble cadena de forma estable. El sistema AccuProbe[®] emplea una sonda de una cadena simple de DNA con un marcador quimioluminiscente que es complementaria del RNA ribosómico del microorganismo diana, de modo que la sonda de DNA marcada se combina con el RNA ribosómico extraído para formar un híbrido estable marcado, que es detectado mediante un luminómetro. El resultado positivo se produce cuando la lectura del luminómetro es igual o mayor al *cut-off*. Un valor más bajo, indica un resultado negativo. Se trata de una técnica rápida, sencilla y específica, pero que presenta una serie de inconvenientes como son: i) la identificación de un número limitado de especies (*M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *M. kansasii* y *Mycobacterium goodii*); ii) el microbiólogo debe, según su sospecha diagnóstica, decidir cuál es el tipo de sonda que va a utilizar.

La sonda específica de *M. kansasii* permite la identificación de aislados de esta especie tanto a partir de medios sólidos (Löwenstein-Jensen o Middlebrook 7H10 o 7H11), tan pronto como el crecimiento es visible y durante los siguientes seis días de incubación, como a partir de medios líquidos cuando la turbidez es igual o mayor al patrón nº 1 de la escala de McFarland. En los inicios de su comercialización, se observó que la sonda de DNA sólo hibridaba con el genotipo I, por lo que se mejoraron las características de la sonda. De hecho, en el trabajo publicado por Richter *et al.* (1999) se comprobó por otras técnicas moleculares que las cepas de *M. kansasii* incluidas en su estudio y que no eran identificadas por la nueva versión de la sonda AccuProbe[®] pertenecían todas a la subespecie VI, y las cepas correspondientes a la especie *M. goodii* eran identificadas correctamente como negativas.

En los últimos años, se han desarrollado técnicas comerciales de PCR, que permiten la identificación simultánea de varias especies micobacterianas mediante un método de hibridación inversa, como es el caso

de los ensayos INNO-LiPA[®] Mycobacteria v2 y GenoType[®] *Mycobacterium* CM. En el ensayo INNO-LiPA[®], la diana de amplificación es la región espaciadora 16S-23S rRNA y permite la identificación de 16 especies del género *Mycobacterium* a partir de cultivos sólidos y líquidos, en función de las diferencias de los nucleótidos de dicha región y además, permite distinguir subtipos dentro de la especie *M. kansasii*. Así, el DNA biotinilado hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos, inmovilizados como sondas paralelas sobre tiras de nitrocelulosa, previa extracción del material genómico y amplificación de la región espaciadora 16S-23S del rRNA. Los productos de la amplificación se hibridan usando una tira de tipificación que lleva fijadas 22 sondas de DNA paralelas y dos sondas de control. El estudio de *M. kansasii* por este método permite su diferenciación en tres grupos: *M. kansasii* - 1, *M. kansasii* - 2 y *M. kansasii* - 3 que se corresponde con *M. kansasii* subespecie I, *M. kansasii* subespecie II y *M. kansasii* subespecies III a V y *M. gastri*. Mientras que en el caso de GenoType *Mycobacterium* CM, la diana de amplificación es el gen 23S rRNA y permite la identificación simultánea de diferentes especies micobacterianas entre las que se encuentra *M. kansasii* a partir de cultivos en medios sólidos y líquidos. Este tipo de prueba no permite la diferenciación entre los distintos genotipos de *M. kansasii*.

En un estudio realizado por Padilla *et al.* (2004), en el que se evaluaron ambos métodos, el porcentaje global de concordancia fue del 91,0%. Para muestras con resultados interpretables, el test INNO-LiPA[®] identificó correctamente 109 of 110 (99,1%), mientras que GenoType[®] identificó correctamente 100 of 102 (98,0%), consiguiéndose mayor sensibilidad con el primero de los equipos. Todos los aislados de *M. kansasii* fueron correctamente identificados por ambos métodos, pero además el ensayo INNO-LiPA[®] Mycobacteria permitió la diferenciación de las cepas de esta especie en distintos genotipos. De este modo, 14 aislados de *M. kansasii* fueron identificados como *M. kansasii* grupo I, dos cepas como grupo II y cuatro aislados procedentes de fuentes ambientales fueron identificados como pertenecientes al grupo MKA-3 que reacciona específicamente con *M. kansasii* genotipo III, IV, V y *M. gastri*. Richter *et al.* (2006) realizan una evaluación de

esta técnica comercial para la identificación de las especies micobacterianas más relevantes, concluyendo que se trata de un método fácil de realizar y que permite una identificación rápida y específica, aunque encontraron dificultades para la identificación de algunas biotipos menos frecuentes como *M. kansasii* genotipo VI y *M. intracellulare* serovariedad 7.

1.6.3 Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.

M. kansasii es una de las micobacterias no tuberculosas que muestran mayor sensibilidad a los tuberculostáticos clásicos. Las cepas no tratadas de *M. kansasii* son inhibidas *in vitro* por la rifampicina y rifabutina (Wallace *et al.*, 1994), isoniazida, etambutol, etionamida, estreptomicina, amikacina y sulfametoxazol (Ahn *et al.*, 1987), claritromicina (Wallace *et al.*, 1994), y las nuevas quinolonas (Gay *et al.*, 1984), a concentraciones fácilmente alcanzables en suero con las dosis terapéuticas habituales, aunque hay información limitada sobre la utilidad clínica de algunos de estos fármacos (Ahn *et al.*, 1987; Wallace *et al.*, 1994). Los aislados son generalmente resistentes a los niveles séricos de ácido p-aminosalicílico, capreomicina, y pirazinamida. La pirazinamida no puede ser considerada por tanto, una alternativa puesto que todos los aislados de *M. kansasii* son resistentes a este fármaco (Wallace *et al.*, 1997).

Las recomendaciones de NCCLS (2003), actualmente CLSI, sobre la selección de antimicrobianos que deben ser ensayados se basan en los criterios de la American Thoracic Society (ATS) (Wallace *et al.*, 1997) concernientes al tratamiento adecuado de estos procesos.

Aunque las cepas salvajes de *M. kansasii* son inicialmente sensibles a rifampicina, se puede desarrollar una resistencia adquirida durante el tratamiento (Ahn *et al.*, 1987; Wallace *et al.*, 1994). Dado que el fallo terapéutico se asocia fundamentalmente a resistencia a este antibiótico, tanto CLSI (NCCLS, 2003) como ATS (Wallace *et al.*, 1997) recomiendan en principio evaluar sólo la sensibilidad a este fármaco, utilizando para ello los criterios interpretativos empleados para *M. tuberculosis* (punto de corte que

indica resistencia 1 mg/ml) (Wallace *et al.*, 1994). No se requieren estudios de sensibilidad especiales para los pacientes tratados con inhibidores de las proteasas, ya que los aislados sensibles a rifampicina también lo son a rifabutina (NCCLS, 2003). No se recomienda la realización de forma rutinaria de un estudio de sensibilidad frente a isoniazida y etambutol, ya que normalmente el tratamiento de los aislados sensibles a rifampicina es empírico. Aunque existen algunas cepas con resistencia de bajo nivel a la isoniazida (0,2-1 µg/ml) y a la estreptomina (2 µg/ml), no parece tener una gran importancia clínica ni terapéutica, siempre que se incluya en el régimen la rifampicina.

Las concentraciones críticas de rifampicina (1 mg/L) y etambutol (5 mg/L) utilizados para los estudios de sensibilidad de *M. tuberculosis* complex, inhiben el crecimiento de cepas salvajes de *M. kansasii*, existiendo buena correlación entre los resultados en agar 7H10 y los métodos de dilución en medio líquido (Hawkins & Gross, 1984; Steadham *et al.*, 1985; Wallace *et al.*, 1986; Ahn *et al.*, 1987; Wallace *et al.*, 1994); sin embargo, el rango de CMI de isoniazida con cepas salvajes de *M. kansasii*, oscila entre 0,5 mg/L y 5 mg/L (Ahn *et al.*, 1987; Muthuswamy *et al.*, 1992), por lo que todas las cepas se muestran resistentes a 0,2 mg/L, y existen resultados variables cuando la CMI es de 1,0 mg/L. Por esta razón no se recomienda utilizar tales concentraciones como punto de corte (Wallace *et al.*, 1997; NCCLS, 2003).

En el caso de aislados resistentes a rifampicina (CMI \geq 1mg/L), CLSI recomienda ocho fármacos (rifabutina, etambutol, isoniazida, estreptomina, claritromicina, amikacina, ciprofloxacino/ofloxacino y una sulfonamida como sulfametoxazol/trimetoprim-sulfametoxazol) que podrían ser incluidos en el estudio de sensibilidad, y para los que aporta información sobre los puntos de corte, y las diferentes técnicas con las que se han obtenido (Ahn *et al.*, 1987; Wallace *et al.*, 1986; Biehle & Cavalieri, 1992; Witzig & Franzblau, 1993; Wallace *et al.*, 1994) (Tabla 1.8).

Así pues, el estudio de la sensibilidad a isoniazida, etambutol, estreptomina, claritromicina y nuevas quinolonas se debería realizar en todos aquellos casos en los que la observación microscópica o el cultivo de las

muestras fuesen persistentemente positivos, en las recaídas durante el tratamiento, y cuando se aíse una cepa de *M. kansasii* resistente a rifampicina (Wallace *et al.*, 1997; Woods, 2000).

Tabla 1.8.- Antibióticos para los que CLSI aporta recomendaciones.

Antimicrobiano	Punto de corte (mg/L)	Métodos		
		Proporciones	Bactec 460 TB	Microdilución
Primera línea				
Rifampicina	1	SI		SI
	2		SI	
Segunda línea				
Rifabutina	2	SI		SI
Etambutol	5	SI	SI	SI
Isoniazida ¹	5	SI	SI	SI
Estreptomina ¹	10	SI	SI	SI
Claritromicina ^{1,2}	16	SI	SI	SI
Amikacina ¹	32			SI
Ciprofloxacino ^{1,3}	2			SI
Cotrimoxazol	2/38			SI
Sulfametoxazol ¹	32			SI

¹: existe poca información sobre las condiciones óptimas de ensayo y las concentraciones; ²: clase representativa para los nuevos macrólidos; ³: debe ser utilizado como clase representativa de viejas fluoroquinolonas.

Por lo que se refiere a los métodos empleados en la realización del estudio de sensibilidad, el sistema comercial radiométrico (Hawkins & Gross, 1984; Steadham *et al.*, 1985), el método de las proporciones modificado en 7H10 agar (Wallace *et al.*, 1994; Steadham *et al.*, 1985) y el método de microdilución en caldo (Wallace *et al.*, 1986; Ahn *et al.*, 1987; Wallace *et al.*, 1994) han sido utilizados para realizar estudios con fármacos de primera y segunda línea (Tabla 1.8). El objetivo tanto del sistema radiométrico como del método de las proporciones es determinar si, en presencia de una concentración crítica del fármaco, el crecimiento supera el 1% de la población bacteriana obtenida paralelamente en otro cultivo con el mismo medio pero sin fármaco, mientras que los métodos de microdilución se utilizan para determinar la CMI (Franzblau *et al.*, 1998; Palomino *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Guna

et al., 2004, 2005). El sistema Bactec[®] 460 TB, es un método muy rápido (4-7 días), aunque hoy en día está siendo sustituido por el sistema fluorométrico Bactec[®] MGIT 960, con el cual se empiezan a hacer estudios comparativos (Guna *et al.*, 2006). Apenas existe experiencia con el método de difusión en agar E-test[®], aunque los datos preliminares son prometedores (Alcaide y Benítez, 1999).

1.7 Tratamiento.

No existen ensayos randomizados sobre el tratamiento de la enfermedad causada por *M. kansasii*, que comparen un régimen terapéutico con otro o con la ausencia de tratamiento. Sin embargo, se han realizado varios estudios prospectivos y retrospectivos de distintos regímenes terapéuticos (Pezzia *et al.*, 1981; Jenkins *et al.*, 1994) que aportan una buena base para establecer recomendaciones de tratamiento.

Los primeros informes sobre el tratamiento con antimicobacterianos corresponden al periodo prerifampicina. Al principio, los porcentajes de conversión del esputo a los 6 meses oscilaban entre el 52% y el 81%, y el índice de recaídas era aproximadamente del 10% en pacientes que habían mostrado una buena respuesta inicial (Jenkins *et al.*, 1960; Pezzia *et al.*, 1981). Con la introducción de la rifampicina, los resultados mejoraron enormemente, de modo que el índice de conversión del esputo a los cuatro meses fue del 100% en los 180 pacientes valorados en tres estudios (Ahn *et al.*, 1981 y 1983; Pezzia *et al.*, 1981). Hubo dos casos de fracaso terapéutico (incidencia del 1,1%), en los que se producía inicialmente conversión del esputo, pero los cultivos volvían a ser positivos cuando todavía estaban recibiendo tratamiento. Los dos pacientes habían sido tratados con isoniazida, rifampicina y etambutol, y ambos fallos se asociaron con el desarrollo de resistencia a la rifampicina (Pezzia *et al.*, 1981). Los porcentajes de recaídas a largo plazo con regímenes que contenían rifampicina, también parecen ser muy bajos, con sólo una recaída (0,8%) informada entre los 134 pacientes que recibieron seguimiento durante un largo periodo de tiempo en los tres estudios (Ahn *et al.*, 1981;

Pezzia *et al.*, 1981; Banks *et al.*, 1983). Son por tanto diversos estudios los que muestran que la rifampicina es el fármaco más eficaz, debiendo administrarse en todos los tratamientos iniciales. Sin embargo, la resistencia adquirida a este fármaco durante el tratamiento es una realidad que queda plasmada por un incremento de las recaídas en los últimos años (Alcalde y Benítez, 1999).

La recomendación habitual para el tratamiento de la enfermedad pulmonar causada por *M. kansasii* en adultos incluye isoniazida (300 mg/día), rifampicina (600 mg/día) y etambutol (25 mg/Kg/día durante los dos primeros meses y luego 15 mg/Kg/día) en régimen diario durante 18 meses, con cultivos de esputo negativos durante al menos 12 meses (Sauret *et al.*, 1995; Wallace *et al.*, 1997).

En el caso de los pacientes infectados por el VIH que están recibiendo inhibidores de proteasas, debido a que la rifampicina acelera enormemente el metabolismo de estos fármacos, se debe sustituir la rifampicina por claritromicina o por rifabutina si el paciente está recibiendo indinavir. Ninguno de estos regímenes de tratamiento han sido evaluados clínicamente, pero en principio parece que dan buenos resultados (Wallace *et al.*, 1997). Por tanto, en pacientes que no toleran alguno de los tres fármacos de primera línea, la claritromicina podría ser una alternativa razonable.

El uso de regímenes intermitentes o de corta duración no ha sido suficientemente investigado. Hay un estudio sobre 40 pacientes, en el que se demostró que añadiendo de forma intermitente estreptomina (1g/2 veces/semana) durante los tres primeros meses, a la triple terapia dada durante 12 meses, se producía la aparente curación de todos excepto uno de los enfermos (Ahn *et al.*, 1983). El British Medical Research Council realizó un ensayo en 155 pacientes adultos (Jenkins *et al.*, 1994) con dosis bajas de etambutol diario (15 mg/kg) y rifampicina diaria dados durante 9 meses. La negativización del esputo se consiguió en el 99,4% de los pacientes, pero con un porcentaje de recaída del 10% en 5 años de seguimiento.

En pacientes adultos con resistencia a rifampicina por tratamiento previo, una opción terapéutica consiste en altas dosis diarias de isoniazida (900 mg), piridoxina (50 mg/d), etambutol (25mg/kg/d) y sulfametoxazol (1g/3 veces/día) hasta la negativización de los cultivos en 12-15 meses (Ahn *et al.*, 1987; Wallace *et al.*, 1994). La excelente actividad *in vitro* de claritromicina frente a *M. kansasii* sugiere que este antibiótico también sería útil en los regímenes de retratamiento, permitiendo quizá la omisión de aminoglucósidos (Wallace *et al.*, 1997). Las nuevas quinolonas pueden también ser potencialmente útiles en este sentido, pero no han sido suficientemente estudiadas (Wallace *et al.*, 1997).

Para el tratamiento de la enfermedad extrapulmonar en adultos, el régimen de fármacos antimicobacterianos debería ser el mismo que para la enfermedad pulmonar (Anonymous, 1990). En las linfadenitis, el tratamiento de elección es la exéresis quirúrgica, y la terapia con azitromicina o claritromicina asociados a rifabutina, etambutol o ciprofloxacino debe emplearse en casos de afectación extensa, resección incompleta o recurrencia (Wallace *et al.*, 1997). El tratamiento de las infecciones cutáneas es controvertido (Chaves *et al.*, 2001). Según la ATS debe aplicarse un tratamiento similar al de la enfermedad pulmonar (Anonymous, 1990); no obstante, algunos autores proponen un cuarto fármaco (Tartaglione, 1997), aunque otros han conseguido buenos resultados con un único antibiótico como eritromicina durante varios meses (Groves *et al.*, 1991).

El régimen terapéutico recomendado por la American Thoracic Society (Anonymous, 1990) para la enfermedad diseminada incluye rifampicina, isoniazida y etambutol durante 18 meses. Ibarrola *et al.* (2001) describen un caso de enfermedad diseminada en una paciente con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, en el que debido a la mala tolerancia de la paciente a la rifampicina, ésta fue sustituida por una quinolona, y posteriormente se añadió claritromicina y amikacina, dada la resistencia de la cepa a la isoniazida.

2 Objetivos

En los últimos años, *M. kansasii* se ha perfilado como la principal micobacteria no tuberculosa causante de enfermedad en población no infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana en muchas partes del mundo. La manifestación clínica más frecuente es la enfermedad pulmonar, que presenta un curso clínico muy similar al de la enfermedad producida por *M. tuberculosis*. Se trata de una micobacteria, por lo general sensible a los tuberculostáticos clásicos, y los fallos terapéuticos se asocian comúnmente a casos de resistencia adquirida a la rifampicina.

Este organismo, atendiendo a sus características fenotípicas es considerado como una especie muy homogénea; no obstante, diferentes estudios señalan la existencia de variantes fenotípicas que han permitido la descripción de biotipos, algunos de ellos relacionados con determinados estados mórbidos. En los últimos años ha sido descrita la existencia de siete genotipos (I a VII), uno de los cuales, el genotipo I, es el aislado mayoritariamente en procesos humanos. Por otro lado, diferentes métodos de tipificación molecular han sido utilizados como marcadores epidemiológicos, y la mayoría de los estudios realizados señalan que los aislados del genotipo más prevalente, el genotipo I, muestran una marcada clonalidad.

Los objetivos del presente estudio han sido:

1. Conocer cuales son los biotipos y los genotipos de *M. kansasii* circulantes en el área de influencia del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
2. Evaluar el poder discriminatorio de diferentes marcadores epidemiológicos moleculares para poder inferir cuál es el grado de diversidad clonal de *M. kansasii*, en un genotipo dado.
3. Estudiar la sensibilidad-resistencia de dicho organismo a compuestos antibióticos y no antibióticos, y valorar la utilidad de un método semiautomático para los estudios de sensibilidad antimicrobiana.

Por lo que ha sido necesario: i) Caracterizar fenotípicamente mediante métodos convencionales, culturales y bioquímicos, los aislados clínicos objeto de estudio; ii) Corroborar mediante hibridación con sondas de DNA específicas la identificación fenotípica; iii) Identificar los genotipos mediante amplificación de la región espaciadora del fragmento 16S-23S rRNA y posterior hibridación inversa; iv) Implementar procedimientos moleculares con fines epidemiológicos, como la separación electroforética en campo pulsante (PFGE) y el análisis de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP); v) Determinar mediante un método de microdilución en caldo la concentración mínima inhibitoria de compuestos seleccionados, y evaluar la utilidad de un método semiautomático para los estudios de sensibilidad a los fármacos utilizados en el tratamiento de las infecciones producidas por *M. kansasii*.

3 Material y métodos

3.1 Origen de los aislados.

Para el presente estudio fueron seleccionados 103 aislados clínicos, correspondientes a 89 pacientes, de la colección de microorganismos del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), identificados como *M. kansasii*. Además, se incluyeron la cepa *M. kansasii* CECT 3030 perteneciente a la Colección Española de Cultivos Tipo, y una cepa *M. kansasii* tipo VI, validada como tal por el Programa de Control Externo de Calidad SEIMC en el envío MB 2/05 (Control de Calidad SEIMC, 2005). Los microorganismos objeto de estudio fueron aislados durante un período de doce años (1992 a 2003); algunos de ellos fueron remitidos por los laboratorios de Microbiología de hospitales de la red sanitaria de la provincia de Valencia (Hospital Lluís Alcanyís, de Xàtiva; Hospital de Requena; Hospital de Sagunt; Hospital Universitario Doctor Peset, de Valencia; Instituto Valenciano de Oncología, de Valencia) para su identificación y estudio de sensibilidad a los tuberculostáticos, y los restantes fueron obtenidos en el Servicio de Microbiología del HCUV, mediante aislamiento en cultivo en medio de Löwenstein-Jensen (Biomedics SL, Tres Cantos, Madrid) y/o Mycobacterial Growth Indicator Tubes (MGIT) (Becton Dickinson, Microbiology Systems, Sparks, MD) a partir de muestras clínicas de pacientes de diferentes Departamentos de Salud de la citada provincia (HCUV; Hospital General Universitario de Valencia; Hospital San Francesc de Borja, Gandía) (Figura 3.1; Tabla 3.1).

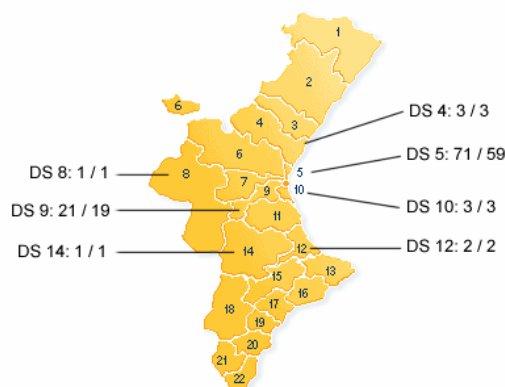


Figura 3.1.- Origen de los aislados / pacientes
DS: Departamento de Salud

Tabla 3.1.- Departamentos de Salud de procedencia de los pacientes.

Departamento de Salud	Hospital de referencia	Pacientes	%	Aislados	%
5	Hospital Clínico Universitario	59	66,3	71	68,9
9	Hospital General Universitario	19	21,4	21	20,4
10	Hospital Universitario Dr. Peset	3	3,4	3	2,9
4	Hospital de Sagunt	3	3,4	3	2,9
12	Hospital San Francesc de Borja	2	2,2	2	1,9
14	Hospital Lluís Alcanyís	1	1,1	1	1,0
8	Hospital de Requena	1	1,1	1	1,0
IVO	Instituto Valenciano de Oncología	1	1,1	1	1,0
Total		89	100	103	100

Los aislados procedían de pacientes de ambos sexos, siendo la proporción hombre-mujer de 2,6:1 (69,7% hombres frente al 27,0% mujeres). El 28,1% de los mismos correspondían a pacientes VIH positivos, y tan sólo en cuatro casos (4,5%) era conocida con certeza la ausencia de infección por VIH (Tabla 3.2).

Tabla 3.2.- Distribución de los aislados según sexo de los pacientes y estado serológico frente al virus de la inmunodeficiencia humana.

Sexo	Presencia de anticuerpos frente a VIH						Total	
	Positiva		Negativa		Desconocida		Nº de casos	%
	Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos	%		
Hombre	15	24,2	3	4,8	44	71,0	62	69,7
Mujer	10	41,7	1	4,2	13	54,1	24	27,0
NC ^a	–	–	–	–	3	100	3	3,3
Total	25	28,1	4	4,5	60	67,4	89	100

^a: no constaba; se trataba de tres cepas remitidas para identificación y estudio de sensibilidad a los tuberculostáticos

La mayoría de ellos fueron aislados a partir de muestras de aparato respiratorio, siendo la proporción de éstas frente a las de otro origen de 11,8:1 (92,2% frente a 7,8%) y la expectoración directa fue la fuente de aislamiento más común (Tabla 3.3).

Tabla 3.3.- Muestras a partir de las cuales se obtuvieron los diferentes aislados.

Localización anatómica					
Aparato respiratorio	Nº de aislados	%	Extra-respiratoria	Nº de aislados	%
Espeto ^a	80	77,7	Pus	2	1,9
Aspirado bronquial	9	8,7	Orina	2	1,9
Líquido pleural	3	2,9	Biopsia cutánea	1	1,0
Lavado broncoalveolar	1	1,0	Líquido pericárdico	1	1,0
Biopsia pleural	1	1,0	Líquido sinovial	1	1,0
Espeto inducido	1	1,0	Heces	1	1,0
Total	95	92,2	Total	8	7,8

^a: están incluidas 10 cepas que fueron remitidas para identificación y estudio de sensibilidad a los tuberculostáticos.

Las características clínico-epidemiológicas de los pacientes así como los especímenes biológicos, el número de aislados por paciente y su código de identificación, están recogidos en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4.- Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y código de los aislados.

Paciente				Diagnóstico	Muestra	Fecha	Nº de Muestra	Código
Caso	Edad	Sexo	Área					
1	NC	V	A	Infección en VIH	O	01/03/92	212573	MK92-01
2	31	M	A	FOD en VIH	E	12/05/92	224398	MK92-02
3	NC	V	B	Sospecha de TBC	BAS	12/05/92	224520	MK92-03
4	NC	M	A	VIH	E	17/05/92	224732	MK92-04
5	35	V	A	VIH	E	23/05/92	226330	MK92-05
6	31	V	A	FOD en VIH	O	24/05/92	226576	MK92-06
7	NC	M	A	Infección en VIH	E	28/05/92	227613	MK92-07
8	NC	M	B	Sospecha TBC en VIH	E	08/07/92	236375	MK92-08

Tabla 3.4 (continuación).- Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y código de los aislados.

Paciente				Diagnóstico	Muestra	Fecha	Nº de Muestra	Código
Caso	Edad	Sexo	Área					
9	NC	V	B	No consta	E	11/07/92	236569	MK92-09
10	60	V	A	Antigua TBC	E	12/07/92	236574	MK92-10
11	77	V	A	S. constitucional en VIH	E	22/07/92	241997	MK92-11
				TBC en tratamiento	E	19/01/93	304245	MK93-04
12	45	V	A	Fiebre	E	08/01/93	300458	MK93-01
				Sospecha de TBC	E	15/01/93	301468	MK93-03
13	45	V	C	No consta	E	09/01/93	300507	MK93-02
14	69	V	A	Derrame pleural	LP	21/01/93	304522	MK93-05
15	35	M	A	S. constitucional en VIH	E	07/02/93	310447	MK93-06
16	37	V	A	Hemoptisis	E	11/03/93	317564	MK93-07
17	NC	NC	E	No consta	E/Cepa	13/06/93	331306	MK93-08
18	48	M	B	FOD en VIH	E	23/06/93	331958	MK93-09
19	80	V	A	TBC	E	11/07/93	341085	MK93-10
20	NC	M	D	Sospecha de TBC	E	21/07/93	341797	MK93-11
21	64	V	B	Absceso pulmonar	E	17/08/93	345100	MK93-12
22	49	V	B	Sospecha de TBC	E	08/09/93	350219	MK93-13
23	29	V	A	Infección respiratoria	E	11/10/93	353128	MK93-14
24	31	M	A	Hemoptisis	E	26/10/93	355935	MK93-15
25	NC	M	A	Tos y expectoración	E	12/11/93	373823	MK93-16
26	NC	V	E	No consta	E	10/12/93	380814	MK93-17
27	35	V	A	Fiebre	BAS	23/12/93	383954	MK93-18
28	NC	M	A	Sospecha de TBC	E	23/01/95	505640	MK95-01
29	44	V	B	Infiltrado LSD, TBC?	E	08/02/95	510643	MK95-02
30	NC	M	H	Sospecha de TBC	E	15/02/95	511547	MK95-03

Tabla 3.4 (continuación).- Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y código de los aislados.

Paciente				Diagnóstico	Muestra	Fecha	Nº de Muestra	Código
Caso	Edad	Sexo	Área					
31	61	V	A	Infección respiratoria	E	17/02/95	511943	MK95-04
32	66	M	A	Asma	E	23/03/95	513039	MK95-05
33	35	V	H	Fiebre en VIH	E	29/03/95	514944	MK95-06
34	19	V	A	Sospecha de TBC	H	14/05/96	625718	MK96-01
35	NC	V	A	Hemoptisis en VIH	E	03/09/98	854539	MK98-01
36	48	V	A	Hemoptisis, TBC?	E	31/03/99	914295	MK99-01
					E	19/04/99	917802	MK99-02
37	70	V	A	TBC	E	01/06/99	928141	MK99-03
					E	22/07/99	939879	MK99-06
38	40	V	A	Hemoptisis, TBC antigua	E	30/06/99	935157	MK99-04
					E	31/10/00	061220	MK00-10
39	28	V	A	Infiltrado en LSD	BAS	20/07/99	939397	MK99-05
40	42	V	A	TBC pulmonar	E	09/08/99	942971	MK99-07
					E	06/09/99	947805	MK99-11
41	NC	V	F	Baciloscopia positiva	E	17/08/99	944470	MK99-08
42	44	V	B	Infiltrado pulmonar, TBC?	E	25/08/99	945808	MK99-09
					EI	03/09/99	947420	MK99-10
43	57	V	A	Infección en EPOC	E	06/09/99	948020	MK99-12
44	NC	V	A	Sospecha de TBC	E/Cepa	30/09/99	953401	MK99-13
45	NC	V	A	Sospecha de TBC	E	20/10/99	957720	MK99-14
46	26	V	B	Adenopatías	E	26/10/99	958972	MK99-15
47	23	M	B	Sospecha de TBC	E	26/10/99	958975	MK99-16
48	78	V	B	Sospecha de TBC	E	09/11/99	962029	MK99-17
49	NC	V	A	No consta	E	29/11/99	966584	MK99-18
50	NC	M	A	Sospecha de TBC	E	10/12/99	969216	MK99-19

Tabla 3.4 (continuación).- Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y código de los aislados.

Paciente				Diagnóstico	Muestra	Fecha	Nº de Muestra	Código
Caso	Edad	Sexo	Área					
51	NC	V	A	Infiltrado cavitado LSD	LP	05/01/00	000690	MK00-01
52	70	V	A	Bronquiectasias	E	16/02/00	010846	MK00-02
53	1	M	A	Sospecha de TBC	BAS	12/04/00	023155	MK00-03
54	58	V	A	Bronquiectasias	E	19/06/00	037031	MK00-04
55	48	M	A	Absceso en la mano	Pus	27/06/00	038715	MK00-05
				Síndrome febril	LSV	07/11/00	062547	MK00-12
56	NC	V	B	Infiltrado cavitado. LSD	LBA	06/07/00	040519	MK00-06
57	58	V	B	No consta	E	07/08/00	046403	MK00-07
58	60	V	A	No consta	E	18/08/00	048190	MK00-08
59	30	M	A	Osteoartritis	Pus	24/10/00	059974	MK00-09
60	52	V	A	Condensación LII	BAS	02/11/00	061618	MK00-11
61	44	V	A	Infección respiratoria	E	21/11/00	065520	MK00-13
				Infección por micobacterias	E	25/01/01	1006641	MK01-02
62	NC	V	G	No consta	E/Cepa	10/01/01	1002082	MK01-01
63	69	M	A	Infección respiratoria	E	26/01/01	1006849	MK01-03
64	NC	V	A	Infección respiratoria	E	26/01/01	1007013	MK01-04
65	51	V	A	Linfoma no Hodgking	LP	26/01/01	1007019	MK01-05
66	NC	M	D	Eritema indurado	BC	26/01/01	1007025	MK01-06
67	29	V	B	Fiebre y pancitopenia	E	26/01/01	1007036	MK01-07
68	59	M	B	Derrame pericárdico	LPC	26/01/01	1007038	MK01-08
69	74	M	A	Derrame pleural	BP	26/01/01	1007075	MK01-09
70	85	V	A	Sospecha de TBC	E	21/03/01	1020909	MK01-10
71	41	V	A	Sospecha de TBC	BAS	26/06/01	1068961	MK01-11
72	42	V	A	TBC residual	E	09/07/01	1071444	MK01-12
					E	06/08/01	1076651	MK01-13

Tabla 3.4 (continuación).- Características clínico-epidemiológicas de los pacientes y código de los aislados.

Paciente				Diagnóstico	Muestra	Fecha	Nº de Muestra	Código
Caso	Edad	Sexo	Área					
73	53	V	A	Sospecha de TBC	BAS	16/08/01	1078341	MK01-14
74	75	V	A	Bronquiectasias	E	27/08/01	1080068	MK01-15
75	73	V	A	Infección en EPOC	E	04/09/01	1081363	MK01-16
76	NC	V	I	No consta	E/Cepa	13/09/01	1083345	MK01-17
77	36	V	A	Fiebre	E	08/10/01	1088517	MK01-18
				Sospecha de TBC	E	16/10/01	1089801	MK01-20
78	44	V	B	Sospecha de TBC	E	15/10/01	1089693	MK01-19
					E	05/02/03	3039060	MK03-01
79	86	V	F	No consta	E/Cepa	09/11/01	1094887	MK01-21
80	NC	V	E	No consta	E/Cepa	07/01/02	2031025	MK02-01
81	57	M	B	Sospecha de TBC	E	15/02/02	2039734	MK02-02
82	NC	M	A	Infección por micobacterias	E	21/03/02	2046836	MK02-03
83	33	V	B	No consta	E	29/04/02	2054207	MK02-04
84	88	M	A	Hemoptisis	E	24/09/02	2082186	MK02-05
					BAS	27/09/02	2082889	MK02-06
85	NC	NC	A	Sospecha de TBC	E/Cepa	04/10/02	2084213	MK02-07
					E/Cepa	04/10/02	2084214	MK02-08
86	53	V	B	Sospecha de TBC	E	13/11/02	2092101	MK02-09
87	44	V	A	No consta	BAS	07/02/03	3039511	MK03-02
88	49	V	F	No consta	E/Cepa	20/02/03	3042670	MK03-03
89	NC	NC	A	No consta	E/Cepa	04/03/03	3045280	MK03-04

^aA: Hospital Clínico Universitario de Valencia; B: Hospital General Universitario de Valencia; C: Hospital comarcal de Requena; D: Hospital Francesc de Borja de Gandía; E: Hospital Universitario Dr. Peset; F: Hospital de Sagunto; G: Instituto Valenciano de Oncología; H: Hospital Malvarrosa; I: Hospital Lluís Alcanyis de Xàtiva. ^bBAS: Aspirado bronquial; LBA: Lavado broncoalveolar; E: Espujo; EI: Espujo inducido; BC: Biopsia cutánea; BP: Biopsia pleural; H: Heces; LP: Líquido pleural; LPC: Líquido pericárdico; LSV: Líquido sinovial; O: Orina.

3.2 Mantenimiento de los aislados.

Los aislados objeto de estudio estaban conservados a -70°C , suspendidos en solución acuosa de glicerol (Merck, Darmstadt) al 10% (v/v) (Tison *et Carbonelle*, 1972). Con el fin de comprobar la viabilidad y pureza de los aislados seleccionados, se llevó a cabo su descongelación e inoculación en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con OADC al 10% (v/v) (ácido oleico, 0,6 mL -Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO-; albúmina bovina fracción V, 50 g -Sigma-Aldrich-; dextrosa, 20 g -Bacto[®] Dextrose, Difco Laboratories-; catalasa, 0,04 g -Sigma-Aldrich-; cloruro sódico, 8,5 g -Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Barcelona-; agua destilada, 1.000 mL -Laboratorios Grifols, Parets del Vallès, Barcelona-) esterilizado por filtración (Acrodisc[®] Syringe Filtres 0,45 μm , Pall Gelman Laboratories, Ann Arbor MI) (Meissner & Falkinham, 1986).

Posteriormente, se realizaron subcultivos para aislamiento en medio Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories) suplementado con OADC al 10% (v/v), que fueron incubados en estufa de 37°C y atmósfera convencional durante 10 días. Una vez crecidas y diferenciadas las colonias, se procedió a corroborar la pureza de los cultivos mediante observación macroscópica y observación microscópica tras tinción de Ziehl-Neelsen. Tras lo cuál, se prepararon réplicas de los cultivos en glicerol (Merck) al 10% (v/v) que fueron conservadas a -70°C .

3.3 Identificación de los aislados.

La identificación al nivel de género y de especie se realizó atendiendo a características fenotípicas (morfo-culturales y metabólicas), corroborándose la identificación de especie mediante sondas específicas.

3.3.1 Identificación fenotípica.

Se llevó a cabo mediante métodos convencionales, siguiendo los criterios descritos por Sommers & Good (1985), Wayne *et al.* (1991), Lévy-Frébault & Portaels (1992) y Shinnick & Good (1994). Así, en el estudio de los

103 aislados clínicos, y la cepa de referencia *M. kansasii* CECT 3030, incluimos las siguientes pruebas:

- **Características culturales:** i) velocidad de crecimiento; ii) producción de pigmento y fotorreactividad; iii) morfología macro y microscópica; iv) crecimiento en medio de MacConkey sin cristal violeta (Difco Laboratories).
- **Pruebas bioquímicas convencionales:** i) reducción de nitratos; ii) acumulación de niacina; iii) catalasa termorresistente (68°C); iv) hidrólisis del Tween 80 (Difco Laboratories); v) reducción del telurito; vi) pirazinamidasas.

Además, se seleccionaron de forma aleatoria 16 aislados, cinco de ellos de pacientes VIH positivos, y la cepa control *M. kansasii* 3030 CECT, para la realización de un estudio de caracterización bioquímica mediante un método semicuantitativo comercial (api[®] ZYM, bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France), el cual estudia 19 actividades enzimáticas. Se siguieron de forma genérica las instrucciones del fabricante y el protocolo descrito por Tortoli *et al.* (1994) con pequeñas modificaciones, de modo que tras resembrar las micobacterias en medio sólido Middelbrook 7H11 (Difco Laboratories) e incubarlas en estufa de 37°C, se preparó una suspensión de cada una de las cepas con agua destilada hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 4-5 de McFarland. Se inoculó cada una de las cúpulas que contenía el sustrato enzimático con 65 µL de suspensión micobacteriana, incubándose durante la noche en estufa de 37°C y atmósfera convencional. Tras dicha incubación se añadió a cada uno de los pocillos una gota del reactivo Zym A y Zym B (bioMérieux), procediéndose a la lectura tras 10 min de exposición a la luz, y valorando la reacción colorimétrica según el patrón aportado por el fabricante.

3.3.2 Identificación molecular al nivel de especie.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos con el estudio de las características morfo-culturales y bioquímicas, se procedió a realizar una identificación molecular con sondas de DNA específicas de *M. kansasii* (Accuprobe[®] Gen-Probe Inc., San Diego, CA). Esta técnica se basa en la

utilización de una sonda de DNA monocatenario con un marcador quimioluminiscente, complementaria del RNA ribosómico del microorganismo diana, produciéndose una hibridación y la formación de un complejo DNA-RNA estable. Los ensayos se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante:

- **Lisis:** i) varias colonias del microorganismo a estudio se resuspenden en 200 μ l de una solución 1:1 (v/v) del reactivo de lisis (Reactivo 1 para la identificación de cultivos, Accuprobe[®] Gen-Probe Inc) y del tampón de hibridación (Reactivo 2 para la identificación de cultivos, Accuprobe[®] Gen-Probe Inc) contenida en un tubo de lisis (Accuprobe[®] Gen-Probe Inc), y se agitan vigorosamente con un *vórtex* (Heidolph Reax-2000, Comecta S.A.); ii) la suspensión es sonicada (Ultrasons, J.P. Selecta S.A., Abrera) durante 15 minutos y calentada a 95°C durante 10 minutos en un bloque calefactor (Twin incubator DG-210, Diagnostic Grifols S.A., Parets del Vallès, Barcelona).

- **Hibridación:** i) 100 μ L de la muestra lisada son transferidos a un tubo de reacción (Accuprobe[®] Gen-Probe Inc) e incubados a 60°C durante 15 minutos, en el bloque calefactor citado anteriormente.

- **Selección:** i) 300 μ L del reactivo de selección (Reactivo 3 para la identificación de cultivos, Accuprobe[®] Gen-Probe Inc) se añaden al tubo de reacción, y la mezcla es agitada vigorosamente en un *vórtex* e incubada a 60°C durante 8 minutos en el bloque calefactor; ii) finalmente se deja enfriar la muestra durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

- **Lectura e interpretación:** La lectura se realizó empleando un luminómetro (Leader[®] 50i, MGM Instruments Inc, Gen-Probe Inc) siguiendo rigurosamente las instrucciones del fabricante, y los resultados superiores a 900 PLU (unidades fotométricas) fueron considerados como positivos.

3.3.3 Identificación genotípica.

Con el fin de llevar a cabo una identificación más exhaustiva de los aislados, y conocer los genotipos circulantes en el área de influencia del HCUV,

se decidió realizar con todos ellos el ensayo INNO-LiPA[®] Mycobacteria v2 (Innogenetics N.V., Belgium), basado en el principio de hibridación inversa mediante la utilización de sondas específicas inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa. El DNA biotinilado, tras la amplificación de la región espaciadora del rRNA ribosómico 16S-23S, se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos, inmovilizadas como sondas paralelas sobre tiras de nitrocelulosa. La detección del producto amplificado unido a la sonda correspondiente se realiza mediante enzimoimmunoensayo, basado en la fijación de la estreptavidina sobre los híbridos biotinilados y su revelado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y el cromógeno nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT). Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante:

- **Extracción del DNA:** se llevó a cabo mediante un procedimiento de lisis térmica, para lo cuál: i) 200 μ L de la biomasa obtenida mediante cultivo en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) suplementado con OADC 10% (v/v) se centrifugaron en tubos *ependorf* estériles (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Germany) a 13.000 r.p.m, durante 15 min (*Eppendorf* Centrifuge 5417 C, Brinkmann Instruments INC, Westbury NY), y el sedimento se centrifugó de nuevo (13.000 r.p.m., 10 s) para eliminar totalmente cualquier resto del medio de cultivo; ii) el sedimento obtenido fue resuspendido en 20 μ L de tampón TE pH 8 (10 mM Tris-HCl, Merck; 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich Co) y la mezcla homogeneizada con *vórtex* (Heidolph Reax-2000, Comecta S.A.); iii) la suspensión fue inactivada mediante calor a 95° C durante 30 min en un bloque calefactor (Twin incubator DG-210, Diagnostic Grifols S.A), centrifugada de nuevo (13.000 r.p.m., 10 s) y sometida a un proceso de congelación a -20° C, durante 30 min; iv) finalmente, se homogeneizó mediante *vórtex* y se centrifugó a 13.000 r.p.m durante 10s. Si la amplificación no se realizaba durante la misma jornada, el proceso podía detenerse durante la congelación del sedimento, reanudándose en este punto al día siguiente.

- **Amplificación de la región intergénica espaciadora 16S-23S rRNA:** La reacción de amplificación se realizó en tubos *ependorf* estériles de 0,2 mL de capacidad (0.2mL Thermotube, ABgene, Epson, Surrey) para un

volumen final de 50 μL que incluía los 10 μL de la muestra que contiene el DNA problema, 10 μL del tampón de amplificación (INNO-LiPA[®] Mycobacteria Amplification kit), 10 μL de solución de *primers* comerciales (INNO-LiPA[®] Mycobacteria Amplification kit), 0,3 μL (5U/ μL) de *Taq* DNA polimerasa (ABgene House, Epsom, Surrey, UK) y 19,7 μL de agua bidestilada (Laboratorios Grifols S.A). Se definieron en el termociclador (Progene Techne, Cambridge) las condiciones siguientes: i) un ciclo inicial de 1 min a 95° C; ii) tres series de 40 ciclos de 30 s a 95° C, 62° C y 72° C, respectivamente; iii) un periodo final indefinido a 4° C. Para comprobar que la reacción de amplificación había sido adecuada, se realizó una electroforesis horizontal (Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (Maxicell EC 360 M Electrophoretical System, EC Apparatus Corporation, St Petersburg, Florida) de los fragmentos amplificados a 7,0 V/cm durante 2 horas, en un gel de agarosa (Midi ABgarose, ABgene House) al 2% (p/v) en tampón TBE 1X, pH 8 (90 mM Tris (hidroxymethyl) aminomethane, Merck; 90 mM ácido bórico, Merck; 2 mM EDTA, Sigma-Aldrich Co). En cada análisis se incluyó un patrón de 10 bandas de 1.000 a 100 pb (Supperladder-Low 100bp Ladder, ABgene House). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co) (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ p/v), depositados sobre un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline Transilluminator model TC-312 A, Spectronics Corporation, Westbury) y las imágenes fotografiadas mediante un sistema de captación de imágenes (DC290 Zoom Digital Camera, Eastman Kodak Company, Rochester, NY). Los amplificados se conservaron en nevera a 4° C hasta el momento de su utilización.

- **Hibridación:** Todo el proceso se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, empleando para ello un sistema automatizado, *Auto-LiPA* (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) que permite mediante calentamiento - enfriamiento, aspiración y pipeteado automatizados ejecutar en su totalidad las fases de hibridación, lavado astringente y desarrollo de la coloración, seleccionando el programa específicamente diseñado para ello. Para lo cuál: i) las soluciones de hibridación (Hybridization Solution, Innogenetics N.V.) y de lavado astringente (Stringent Wash Solution,

Innogenetics N.V.) fueron introducidas en los reservorios correspondientes para que alcanzasen la temperatura de 62°C; ii) se prepararon diluciones 1:5 (v/v) de la solución de lavado (Rinse Solution, Innogenetics N.V.) con agua destilada, y 1:100 (v/v) del conjugado (Conjugate 100X, Innogenetics N.V.) y del sustrato (Substrate 100X BCIP/NBT, Innogenetics N.V.) con sus correspondientes diluyentes (Conjugate Diluent; Substrate Buffer, Innogenetics N.V.), que fueron depositadas en sus respectivos reservorios; iii) las tiras de nitrocelulosa eran colocadas en los canales de la bandeja, en un extremo de los mismos se agregaban 10 µL de solución de desnaturalización (Denaturation Solution, Innogenetics N.V.) y 10 µL de DNA amplificado, y se iniciaba el proceso. La lectura e interpretación de los resultados se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 3.5; Figura 3.2).

Tabla 3-5.- Interpretación del ensayo INNO-LiPA

Líneas reactivas		Sonda	Grupos taxonómicos
1 y 2	X		
+	4	MKA-1	<i>M. kansasii</i> genotipo I
+	5	MKA-2	<i>M. kansasii</i> genotipo II
+	6	MKA-3	<i>M. kansasii</i> genotipos III a V <i>Mycobacterium gastri</i>

1: control de reacción; 2: específica de género;
X: específica de complejo, especie o grupo taxonómico.

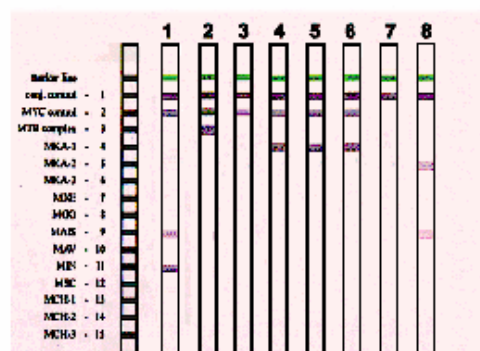


Figura 3.2.- Resultados del ensayo INNO-LiPA.

3.4 Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.

La actividad *in vitro* de diferentes compuestos, antibióticos y no antibióticos, frente a los 103 aislados clínicos y las cepas de control (*M. kansasii* CECT 3030 y *M. kansasii* tipo VI) se determinó mediante un método de microdilución en medio líquido. Además, se realizó un estudio sobre la eficacia del Sistema Bactec[®] MGIT 960 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) para los ensayos de sensibilidad de *M. kansasii* a los tuberculostáticos clásicos.

3.4.1 Compuestos ensayados.

Se ensayaron 19 antibióticos y dos sustancias no antibióticas (Tabla 3.6), algunos de los cuales fueron seleccionados mediante un modelo de topología molecular cuántica desarrollado en el departamento de física-química de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia (García-García *et al.*, 2004 y 2005).

Tabla 3.6.- Compuestos utilizados en los ensayos de sensibilidad.

Compuestos ensayados		Laboratorio	Potencia	Solvente	Punto de corte (mg/L)
Categoría	Nombre				
Tuberculostáticos	Estreptomina	Sigma	777 µg/mg	Agua bidestilada	≥ 10 ^a
	Etambutol	Sigma	1 mg/mg	Agua bidestilada	≥ 5 ^a
	Isoniazida	Sigma	990 µg/mg	Dimetilsulfóxido	≥ 5 ^a
	PAS	Sigma	1 mg/mg	Hidróxido sódico 1N	≥ 2 ^a
	Rifampicina	Sigma	950 µg/mg	Dimetilsulfóxido	≥ 1 ^a
Aminoglicósidos	Amikacina	Flavine	720 µg/mg	Agua bidestilada	≥ 32 ^a
	Kanamicina	Sigma	787 µg/mg	Agua bidestilada	≥ 5 ^a
	Neomicina	Sigma	727 µg/mg	Agua bidestilada	≥ 5 ^{b, c}
	Paromomicina	Sigma	760 µg/mg	Agua bidestilada	–
Macrólidos	Azitromicina	Lesvi	996 µg/mg	Dimetilsulfóxido	≥ 16 ^a
	Claritromicina	Abbott	979 µg/mg	Dimetilsulfóxido	≥ 16 ^{a, d}
Clofazimina	Clofazimina	Sigma	1 mg/mg	Dimetilsulfóxido	≥ 0,5 ^b
Oxazolidinonas	Linezolid	Pharmacia	1 mg/mg	Dimetilsulfóxido	≥ 32 ^{a, e}
Quinolonas	Ciprofloxacino	Bayer	1 mg/mg	Agua destilada	≥ 2 ^a
	Enoxacino	Sigma	1 mg/mg	Hidróxido sódico 1N	≥ 2 ^a
	Enrofloxacin	Chemika Fluka	980 µg/mg	Hidróxido sódico 1N	≥ 2 ^a
	Lomefloxacino	Sigma	1 mg/mg	Agua bidestilada	≥ 2 ^a
	Moxifloxacino	Bayer	1 mg/mg	Agua destilada	≥ 4 ^f
Rifamicinas	Rifabutina	Pharmacia	1 mg/mg	Dimetilsulfóxido	≥ 2 ^a
No antibióticos	Benzalconio	Sigma	1 mg/mg	Agua bidestilada	–
	Trifluoroperazina	Sigma	980 µg/mg	Agua bidestilada	–

^a CLSI (NCCLS, 2003); ^b Heifets, 1996; ^c Pérez *et al.*, 1999; ^d Biehle & Cavalieri, 1992; ^e Brown-Elliott *et al.*, 2003; ^f Gillespie & Billington, 1999.

Las diferentes sustancias fueron disueltas según las recomendaciones citadas en The Index Merck (Anonymous, 1983) (Tabla 3.6), empleándose como solventes agua bidestilada estéril (Laboratorios Grifols

S.A.), dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Co), etanol (Panreac Química S.A.) o hidróxido sódico 1N (Panreac Química S.A). Las diferentes soluciones fueron esterilizadas por filtración (Acrodisc[®] Syringe Filtres 0,45 μ m, Pall Gelman Laboratories) y conservadas a -20°C, hasta su utilización.

En todos los casos, se inocularon placas control con los distintos solventes a la misma concentración que se había empleado para la dilución del fármaco, con el fin de comprobar que no se producía inhibición del desarrollo de los microorganismos. Las soluciones antibióticas de trabajo se prepararon mediante dilución en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories).

3.4.2 Estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La CMI se determinó mediante microdilución en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratorios) a pH 6,8, excepto para los ensayos con claritromicina y azitromicina que estaba ajustado a pH 7,4, según los protocolos descritos por diversos autores (Brown *et al.* 1992; Franzblau *et al.* 1998; Bastian *et al.* 2001) con pequeñas modificaciones. Como soporte se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en "U" (Placas Microtiter, Lab Center S.L Madrid) que contenían 150 μ L de medio de cultivo, y cada ensayo se realizó por duplicado.

- **Concentraciones de antimicrobianos:** Inicialmente se ensayaron diez concentraciones cuyo rango oscilaba entre 32 mg/L y 0,06 mg/L. Además, en algunos compuestos cuando fue necesario se probaron concentraciones superiores o inferiores a las citadas. Con la finalidad de verificar la viabilidad de los aislados y la ausencia de contaminaciones, en todos los ensayos se incluyeron los correspondientes controles negativo (medio de cultivo con la sustancia a estudiar no inoculado) y positivo (medio de cultivo sin la sustancia a estudiar inoculado).

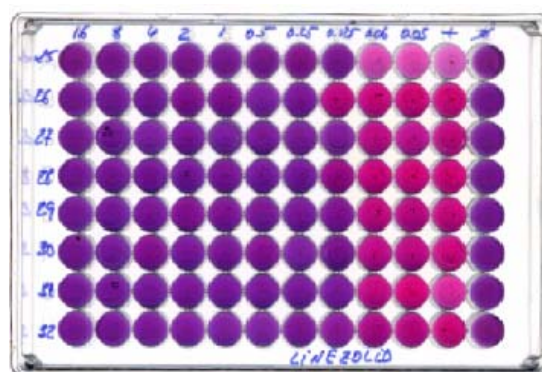
- **Inóculo:** A partir de la biomasa de un cultivo de siete días en medio Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories) se preparó una suspensión en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) que, tras 24h de incubación a

37°C, fue ajustada con un nefelómetro (Sensititre, Trek Diagnostic Systems LTD, Imberhorne Lane) a una absorbancia equivalente al patrón 0,5 de McFarland y diluida 1:10 (v/v) con medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories). Un volumen de 10 µl fue utilizado para la inoculación de los pocillos, excepto de los controles negativos.

- **Incubación:** Las microplacas fueron selladas con Parafilm[®] "M" (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI) e incubadas a 37°C en atmósfera convencional durante 10 días; tras lo cuál, se añadió a cada pocillo 20 µl de Resazurina[®] (Sigma-Aldrich Co) al 0,025% (p/v), como indicador de óxido-reducción. Las microplacas fueron selladas de nuevo e incubadas durante un periodo adicional de 48h.

- **Lectura e interpretación:** Finalizado el periodo de incubación se efectuó la lectura de los ensayos que se basó en la capacidad metacromática de la resazurina, relacionada con los procesos de óxido-reducción, de modo que el crecimiento microbiano determinó un cambio de color azul a rosa (Figura 3.3). Los resultados fueron considerados adecuados cuando el medio de los pocillos control negativo y control positivo era de color azul y de color rosa, respectivamente. Por lo tanto, la CMI quedaba definida por la concentración más baja que producía inhibición visible del crecimiento bacteriano (Figura 3.3), y las CMI₅₀ y CMI₉₀ se definieron como las concentraciones más bajas que inhibían el crecimiento del 50% y 90% de los aislados, respectivamente (Guna *et al.*, 2005).

Figura 3.3.- Resultado de un ensayo de CMI. Puede observarse la variación de color de la resazurina. Pocillos azules: ausencia de crecimiento bacteriano; pocillos rojos: crecimiento bacteriano.



3.4.3 Evaluación de la utilidad del Sistema Bactec[®] MGIT 960 para los estudios de sensibilidad.

Con este fin se efectuó un estudio comparativo de los resultados obtenidos con el sistema automatizado Bactec[®] MGIT 960 System (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) y con los de un nuevo ensayo de microdilución, en el que se incluyeron 73 de los 103 aislados clínicos estudiados.

- **Tuberculostáticos ensayados y puntos de corte:** Se estudió la actividad *in vitro* de estreptomycin, etambutol, isoniazida y rifampicina preparándose las soluciones *stock* y de trabajo, tal como se ha descrito previamente (Tabla 3.6). Los resultados se interpretaron siguiendo los criterios establecidos por CLSI (NCCLS, 2003) para *M. kansasii* (Tabla 3.7).

Tabla 3.7.- Tuberculostáticos ensayados en la evaluación de la utilidad del Sistema Bactec[®] MGIT 960 frente a un método de microdilución para los estudios de sensibilidad.

Tuberculostático	Concentración (mg/L)		
	Puntos de corte	Rango CMI	MGIT 960
Estreptomycin	≥ 10	0,06 a 32	10
Etambutol	≥ 5	0,06 a 32	5
Isoniazida	≥ 5	0,06 a 32	5
Rifampicina	≥ 1	0,06 a 32	1

- **Determinación de CMI mediante microdilución:** Se utilizó el método de microdilución descrito previamente (véase punto 3.4.2), con modificaciones que afectaban al momento de adición de la resazurina y a la lectura de los resultados, que se realizaban antes de la inoculación de las microplacas y a los 10 días de incubación, respectivamente.

- **Estudio de sensibilidad mediante el sistema automatizado Bactec[®] MGIT 960 System:** Este ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante para los estudios de sensibilidad de *M.*

tuberculosis, pero modificando las concentraciones finales de los antibióticos (Tabla 3.7). Los aislados fueron inoculados en tubos MGIT (Becton Dickinson), suplementados con 0,8 mL de OADC (Becton Dickinson) (MGIT960) e incubados en el equipo automatizado Bactec[®] MGIT 960 System (Becton Dickinson), hasta que mostraba una señal positiva de crecimiento. Para preparar la suspensión micobacteriana empleada en los procedimientos de inoculación, el crecimiento bacteriano de los cultivos positivos en MGIT960 era diluido (1:5 v/v) con solución salina si los cultivos habían sido sembrados hacía 3 - 5 días, o utilizado sin diluir si los cultivos eran de 1 o 2 días. En ambos casos, se realizaba una dilución adicional (1:100, v/v) para la inoculación de los tubos control. Para los ensayos de sensibilidad se utilizaron cinco tubos MGIT960 suplementados con 0,8 mL de OADC (Becton Dickinson); uno sin antibióticos (control de crecimiento) y a los restantes, rotulados cada uno con una de las letras del acróstico SIRE (S de estreptomycin; I de isoniazida; R de rifampicina, y E de etambutol), se les añadía 0,1 mL de la correspondiente solución de trabajo para conseguir las concentraciones finales de: 10 mg/L para estreptomycin; 5 mg/L para isoniazida; 1 mg/L para rifampicina, y 5mg/L para etambutol (tabla 3-7) (SIRE-MK). Los tubos control fueron inoculados con 0,5 mL de suspensión micobacteriana diluida (1:100, v/v) y los tubos con fármacos con el mismo volumen de la suspensión micobacteriana diluida (1:5, v/v) o no diluida. Los tubos inoculados eran colocados (siguiendo el orden: control → SIRE) en una gradilla especial (AST NET cariar, 5 nubes; Becton Dickinson) que era introducida en el equipo de incubación - lectura, hasta que el sistema automatizado daba por finalizado el ensayo (Figura 3.4).

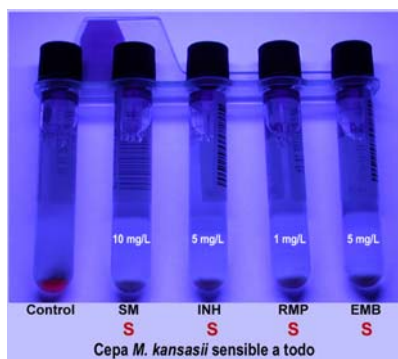


Figura 3.4.- Lectura con luz ultravioleta de un ensayo de sensibilidad SIRE-MK.

- **Controles de pureza y resolución de resultados discrepantes:**

La pureza de los cultivos se comprobó mediante resiembra de todas las suspensiones micobacterianas en placas de agar chocolate (Biomedics) y Middelbrook 7H11 (Difco Laboratories). En el caso del método de microdilución, con el fin de confirmar la ausencia de contaminantes, se realizó una tinción ácido-alcohol resistente de los cultivos. Además, los tubos SIRE-MK que mostraron resistencia a los fármacos, se compararon visualmente con los tubos MGIT-control de crecimiento y cuando el aspecto macroscópico del crecimiento era diferente se realizaba una tinción ácido-alcohol resistente. Los aislados que mostraron resultados discrepantes fueron de nuevo ensayados por ambos métodos y en el caso de la isoniazida y el etambutol, se incluyeron diluciones adicionales (2,5 a 10 mg/L). Los aislados discrepantes se categorizaron como resultados falsamente sensibles y resultados falsamente resistentes.

3.5 Análisis de la diversidad genética.

La posible existencia de variabilidad genética entre los aislados seleccionados se estudió mediante electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE) y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP).

3.5.1 Estudio del DNA cromosómico mediante PFGE.

Se siguió en líneas generales, el procedimiento descrito por Singh *et al.* (1999).

- **Preparación de la biomasa:** Los aislados eran sembrados en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) enriquecido con OADC (10%, v/v), e incubados a 37°C, en atmósfera convencional, durante cinco días. A continuación, a los cultivos se les añadía cicloserina (Sigma-Aldrich Co) (1 mg/mL, p/v), y se reincubaban durante cinco días más. Tras lo cuál, se procedía a su centrifugación (Megafuge 1.0R Heraeus, Kendro Laboratory Products, Germany) a 2.000 r.p.m. durante 20 min, y los sedimentos obtenidos eran resuspendidos en 2 mL de tampón TE 10:10 pH 8 (10mM Tris-HCl, Merck;

10 mM EDTA, Sigma-Aldrich Co), lavados dos veces con el mismo tampón, previa centrifugación (2.000 r.p.m., 20 min; Megafuge 1.0R Heraeus), y finalmente resuspendidos y ajustados con tampón TE 10:10 a una densidad óptica equivalente al patrón 2 de la escala de McFarland. Las suspensiones bacterianas fueron sometidas a tres ciclos de congelación - descongelación, de 10 minutos de duración. Tras el tercer ciclo, un volumen de cada suspensión contenido en tubos *ependorf* (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co) fue tratado con lisozima (Sigma-Aldrich Co) al 1% (p/v), durante 24 horas a 37°C.

- **Preparación de los bloques de agarosa:** Para su preparación, 500 μ L de la biomasa pretratada fueron mezclados (v/v) con agarosa (Chromosomal Grade Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) al 2% (p/v) en tampón TE, mantenida a 50-55°C. La mezcla biomasa-agarosa fue dispensada en moldes (Plug Mold, Sample Chef desposable, Bio-Rad Laboratories), previamente lavados con etanol al 70% (Panreac Química S.A), enjuagados con agua bidestilada (Laboratorios Grifols S.A) y secados en estufa; una vez depositada la mezcla biomasa-agarosa en los moldes, se mantuvieron en nevera a 4° C durante 30 minutos.

- **Proceso de lisis:** Los bloques fueron extraídos de los moldes e introducidos en tubos de 16 x 160 mm con tapón de rosca, a los que previamente se había añadido 5 mL de tampón de lisis constituido por CTAB (1 M ClNa, Panreac Química S.A.; 0,1 M EDTA, Sigma-Aldrich Co; 10 mM Tris-HCl, Merck; 0,5% N-Lauroyl Sarcosine, Sigma-Aldrich Co; 0,2% Sodium deoxycholate, Sigma-Aldrich Co; 0,5% Brij, Sigma-Aldrich Co; 0,5mg/mL de Proteínasa K[®], Sigma-Aldrich Co); se incubaron en horno de hibridación (Unitherm 6/12, Laboran, Orcoyen) a 50°C, en rotación continua, durante 5 días. Tras ello, se procedió a retirar el tampón CTAB y a reincubar los moldes en tampón TE 10:10 pH 8, durante un periodo adicional de 18 horas. Finalmente, se realizaron de 4 a 5 lavados, de 30 minutos de duración, con tampón TE 10:50, pH 8 (10mM Tris-HCl, Merck; 50mM EDTA, Sigma-Aldrich Co) a 50°C y rotación suave en el horno de hibridación previamente citado. Los

bloques fueron guardados a 4°C en tubos *ependorf* (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co) con tampón TE 10:50, pH 8.

- **Restricción del DNA:** Se emplearon dos endonucleasas de restricción, los enzimas *Xba*I (Promega Corporation, Madison, WI) y *Vsp*I (Promega Co) que reconoce las secuencia 5'...T/CTAG A...3' y 5'...AT/TA AT...3', respectivamente. Antes de iniciar la restricción, los bloques fueron lavados con TE 10:1, pH 8 (10mM Tris-HCl, Merck; 1mM EDTA, Sigma-Aldrich Co), en horno de hibridación a 50°C y rotación suave durante 45 minutos, y tratados dos veces sucesivas a 4°C, durante periodos de 30 y 60 minutos, con tampón de restricción (Promega Co) al 10% que contenía seroalbúmina bovina (Promega Co) al 0,1% (tampón de digestión). Tras lo cuál, se retiró el tampón de digestión y los bloques fueron tratados con 150 µL de tampón de digestión conteniendo 30 UI de *Xba*I o 40 UI de *Vsp*I, durante 20 horas a 37°C en el horno de hibridación citado previamente. El proceso finalizó con la retirada del tampón de digestión y la adición de TE 10:1, pH 8.

- **Electroforesis de los fragmentos de restricción:** Para ello, se utilizó el sistema Contour Clamped Homogeneous Electric Field (Chef-DR[®] III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad Laboratories), y se siguió el protocolo de Singh *et al.* (1999) con pequeñas modificaciones, para lo cuál: i) los bloques de agarosa que contenían DNA micobacteriano digerido y el marcador de peso molecular (Pulse Marker 50-1000 kb, Sigma-Aldrich Co) fueron depositados en los pocillos de un gel de agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories) al 1% en tampón TBE 0,5X (Bio-Rad Laboratories) y sellados con un poco de la misma agarosa; ii) el gel era introducido en la interior de la cubeta de electroforesis del sistema Contour Clamped Homogeneous Electric Field (Chef-DR[®] III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad Laboratories) que contenía 2.200 mL de tampón TBE 0,5X. Para evitar la degradación del DNA, al tampón TBE 0,5X (Bio-Rad Laboratories) empleado para el gel y para la cubeta de electroforesis, se le añadió thiourea 50 µM (p/v) (Sigma-Aldrich Co) según los protocolos

descritos por Römmling & Tümmler (2000), Corkill *et al.* (2000) y Zhang *et al.* (2004b). Las condiciones de la electroforesis están recogidas en la tabla 3.8.

Tabla 3.8.- Condiciones de electroforesis en campo pulsado.

Características	Enzima de restricción	
	<i>Vsp I</i>	<i>Xba I</i>
Voltaje y ángulo	6 V/cm (200 V), 120°	6 V/cm (200 V), 120°
Pulsos	1 a 5,6 s x 10h	0,5 a 10s x 10h
	5,6 a 16,6 s x 6h	10 a 17 /seg x 4h
	16,6 a 23 s x 4h	

- **Lectura e interpretación:** Tras la separación electroforética, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co) (0.5 µg/mL) durante 20 min, lavados con agua destilada en agitación suave durante 20 min, y observados mediante transiluminación con luz ultravioleta (Spectroline Transilluminator model TC-312 A, Spectronics Corporation), y las imágenes fueron fotografiadas mediante un sistema de captación de imágenes (DC290 Zoom Digital Camera, Eastman Kodak Company). El tamaño relativo de los fragmentos fue calculado mediante el programa informático 1D Manager versión 2.0 (TDI, Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Alcobendas). Las bandas obtenidas en cada perfil fueron analizadas densitométricamente, determinando su tamaño molecular por comparación con marcadores externos, mediante un modelo matemático que convierte las distancias de migración en tamaños moleculares relativos. La similitud entre los aislados se calculó según el coeficiente de Dice, ($SD = 2^a / 2^{a+b+c}$; dónde “a” es el número de fragmentos apareados, y “b” y “c” el número de fragmentos no apareados de las cepas comparadas) (Struelens *et al.*, 1999), mediante el programa Lane Manager versión 2.1 (TDI), que además permite la agrupación de los aislados en función del nivel de similitud, mediante las comparaciones de los tamaños moleculares (UPGMA, unweighted pair group mathematical average) y la obtención de un dendograma de homología. Los dendogramas de homología se obtuvieron mediante el paquete estadístico SPSS 11.0 para Windows y aplicación del coeficiente de Dice. La interpretación de los patrones

de PFGE obtenidos, se realizó en principio siguiendo los criterios de Tenover *et al.* (1995).

- **Estudio del poder discriminatorio de la técnica:** El poder discriminatorio de un método de tipificación es su capacidad para distinguir entre cepas no relacionadas (Hunter & Gaston, 1988). En este estudio se aplicó el índice de diversidad de Simpson (Hunter & Gaston, 1988; Dillon *et al.*, 1993), siguiendo el protocolo descrito por diferentes autores (Van Looveren *et al.*, 1999; Louie *et al.*, 1996), pero llevando a cabo la comparación de los resultados obtenidos con los diferentes enzimas de restricción. El índice viene dado por la siguiente ecuación:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Donde “N” es el número total de cepas de la muestra, “s” es el número total de tipos descritos y “n_j” es el número de cepas que pertenecen al tipo “j”. Esta ecuación puede ser aplicada tanto para la comparación directa del poder de discriminación de diferentes métodos de tipaje, como para el análisis del poder de discriminación de esquemas de tipaje combinados. Según consideran Hunter & Gaston (1988), el nivel aceptable de discriminación dependerá en cada caso de un gran número de factores, pero un índice mayor del 0,90 sería lo deseable, para que los resultados puedan ser interpretados con confianza.

3.5.2 Estudio de DNA cromosómico mediante AFLP.

El análisis mediante AFLP se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Gaafar *et al.* (2003). Se realizaron una serie de ensayos iniciales, con el fin de encontrar las condiciones óptimas con las que llevar a cabo nuestro análisis AFLP. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente tres cepas pertenecientes a distintos pacientes y se incluyó la cepa control *M. kansasii*

CECT 3030. En estos primeros estudios, se ensayaron a la vez los tres iniciadores (Apa-A, Apa-C y Apa-T) que con la reacción de amplificación, daban mejores resultados, es decir mejores patrones de restricción, según lo descrito por Gaafar *et al.* (2003).

- **Preparación de la biomasa:** Los aislados objeto de estudio fueron sembrados en medio Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories) suplementado con OADC al 10%, e incubados en estufa de 37^aC en atmósfera convencional durante 12 días.

- **Lisis microbiana:** Dos asas bacteriológicas bien cargadas con biomasa procedente del crecimiento obtenido en Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories) fueron transferidas a tubos *ependorf* estériles de microcentrífuga (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co), que contenían 400 μ L de solución TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 8, Merck; EDTA 1mM pH 8, Sigma-Aldrich Co), y la suspensión fue inactivada mediante calentamiento a 80^oC, durante 20 min. Tras lo cual, se añadía lisozima (Sigma-Aldrich Co) al 1% (p/v) y la mezcla se incubaba a 37^oC, durante 18 horas. Al día siguiente, se añadía 75 μ L de solución de SDS (Sigma-Aldrich Co) al 10% (p/v) y Proteinasa K (Sigma-Aldrich Co) al 0,7% (p/v) y se incubaba durante 10 min a 65^oC. Finalmente, 100 μ L de NaCl 5M (Panreac Química S.A.) y 100 μ L de la solución CTAB-NaCl (Sigma-Aldrich Co) precalentada a 65^oC fueron agregados a la mezcla anterior; la solución resultante fue agitada vigorosamente, hasta que el contenido líquido adquirió color blanco lechoso, e incubada durante 10 min a 65^oC.

- **Extracción del DNA cromosómico:** la suspensión obtenida en el proceso de lisis fue diluida (1:1, v/v) con 750 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) (Sigma-Aldrich Co) y la mezcla fue homogeneizada vigorosamente durante, al menos, 10 segundos y posteriormente centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5417 C, Brinkmann Instruments INC) durante 8 minutos a 11.000-13.000 r.p.m. a temperatura ambiente. La fase acuosa obtenida tras la centrifugación fue transferida a un nuevo tubo *ependorff* estéril (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co), y se añadió isopropanol (Panreac Química S.A) de

modo que la mezcla quedara diluida a razón de 1:0,6 (v/v). Se removieron los tubos arriba y abajo, lentamente hasta hacer precipitar el ácido nucleico y luego se dejaron a -20°C durante 30 minutos para acabar centrifugando a 13.000 r.p.m. (Eppendorf Centrifuge 5417 C) durante 15 min; el sedimento obtenido, tras decantación cuidadosa del sobrenadante, fue lavado con 1mL de etanol 70° (Panreac Química S.A) conservado a -20°C, mediante movimientos de inversión de los tubos y centrifugado de nuevo como en el paso anterior durante 5 min. El sedimento obtenido, tras decantar cuidadosamente el sobrenadante, fue secado mediante evaporación del etanol a temperatura ambiente o con aire seco (37°C) en incubador (Unitherm 6/12, Laboran, Orcoyen) durante 15 min. El sedimento fue resuspendido en 50µL de TE 1X pH 8, manteniéndolo en incubador/horno de hibridación a 37°C durante una hora, y finalmente, conservado en nevera a 4°C, hasta su posterior utilización.

- **Cuantificación de la concentración de DNA:** Se realizó mediante la lectura de la densidad óptica de cada muestra a 260-280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Shimatzu UV-160, Shimatzu Corporation, Kyoto). Para los cálculos correspondientes, se estimó que cada unidad de densidad óptica correspondía aproximadamente a 50 µg/mL de DNA de doble cadena (Maniatis *et al.*, 1989).

- **Restricción enzimática de DNA:** Se realizó con la endonucleasa de restricción *ApaI* (ABgene House), que reconoce y corta la secuencia 5´-GGGCC/C-3´. Para lo cuál, el DNA obtenido según el procedimiento previamente descrito fue diluido al 10% con tampón de restricción comercial (ABgene House), de modo que su concentración final fuese de 0,05 µg/mL, y 6 µL de dicha solución fueron tratados con 20U de la endonucleasa a 30°C durante 120 minutos. El DNA digerido fue conservado a 4°C hasta el momento de su utilización.

- **Preparación de los adaptadores de doble cadena:** Se preparó una mezcla equimolecular en tampón PCR 1X (ABgene House) de los oligonucleótidos *Apa-1* (ABgene House) y *Apa-2* (ABgene House) que

reconocen las secuencias 5'-TCG TAG ACT GCG TAC AGG CC-3' y 5'-TGT ACG CAG TCT AC-3', respectivamente, y la hibridación se realizó mediante enfriamiento en termociclador (Progene Techne, Cambridge) desde 80°C a 4°C, con una disminución térmica de 1°C/min. Los adaptadores de doble cadena obtenidos, fueron conservados en nevera a 4°C durante un periodo de tiempo no superior a una semana.

- **Ligación de los adaptadores al DNA digerido e inactivación de la T4 ligasa:** para la reacción de ligación, 10 µl del DNA micobacteriano digerido fueron diluidos (v/v) con tampón de ligación (Promega Corporation, Madison, WI, USA) al 10% (v/v) con 1 U de T4 ligasa (Promega Co) y 0,2 µg del adaptador de doble cadena, e incubados a 37°C, durante 2h, en horno de hibridación (Unitherm 6/12, Laboran). Tras lo cuál y con la finalidad de inactivar la T4 ligasa, las muestras fueron diluidas con 35 µL de agua bidestilada estéril (Laboratorios Grifols S.A.) e incubadas a 65°C durante 10 min, en horno de hibridación. Finalmente, fueron conservadas a 4°C o a -20°C, dependiendo si iban a ser procesadas antes de una semana o no, respectivamente.

- **Amplificación:** La reacción de amplificación se realizó en tubos *ependorf* estériles de 0,2 mL de capacidad (0.2mL Thermotube, ABgene House) que contenían 50 µL de una dilución 1:9 (v/v) del DNA digerido y ligado en tampón de PCR 1X con 1,5mM de MgCl₂ (Abgene House) adicionado de 10% de glicerol (Merck), 1,25 U de Taq DNA polimerasa (ABgene House), deoxinucleótido trifosfato 250 µM (Promega Co), y un único *primer* a una concentración de 1 µM (Abgene House) (Tabla 3.9). Se definieron en el termociclador (Progene) las temperaturas y los tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión, siguientes: i) un ciclo inicial de 5 min a 95°C; ii) treinta y tres ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 2,5 min a 72°C; iii) un periodo de extensión final de 5 minutos a 72°C. Los amplificados fueron conservados a 4°C hasta su utilización.

Tabla 3.9.- Secuencias de los *primers* empleados.

Primer	Secuencia
Apa-A	5' – GAC TGC GTA CAG GCC CA- 3'
Apa-C	5' – GAC TGC GTA CAG GCC CC- 3'
Apa-T	5' – GAC TGC GTA CAG GCC CT- 3'

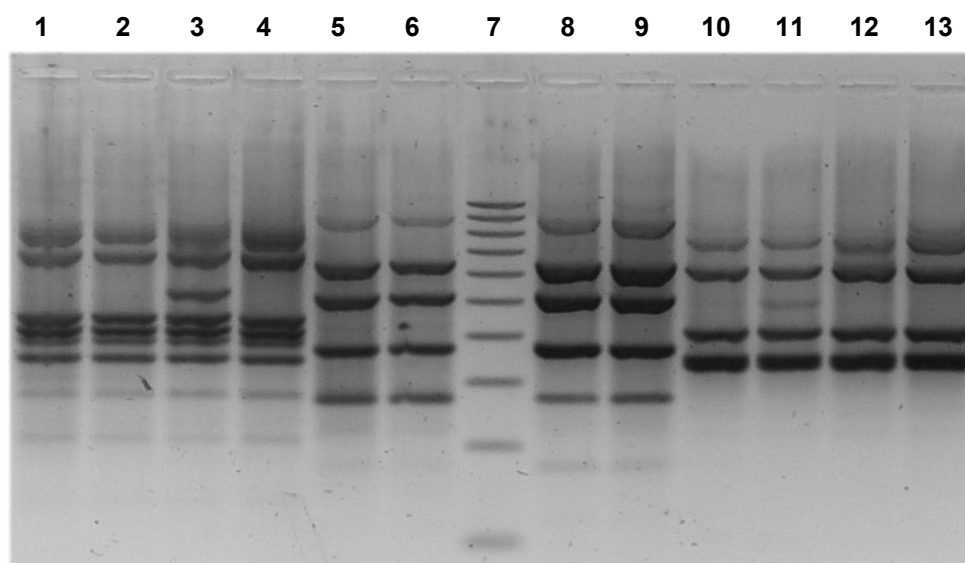


Figura 3.5.- Carreras 1 a 4: perfiles obtenidos con el iniciador Apa-A; carreras 5, 6, 8 y 9: perfiles obtenidos con el iniciador Apa-T; carreras 10 a 13: perfiles obtenidos con el iniciador Apa-C; carrera 7: control de tamaño molecular.

- **Electroforesis y visualización de los fragmentos amplificados:** Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal (Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories) (Maxicell EC 360 M Electrophoretichal System, EC Apparatus Corporation) a 3,5 V/cm durante 4 h, en un gel de agarosa (Midi ABgarose, Abgene House) al 2% (p/v) en tampón TBE 1X pH 8 (90mM Tris hydroxymethyl aminomethane, Merck; 90mM ácido bórico, Merck; 2mM EDTA, Sigma-Aldrich Co). En cada análisis se incluyó un patrón de 10 bandas de 1.000 a 100 pb (Supperladder-Low 100bp Ladder, ABgene House). Los gels fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich

Co) (0,5 µg/mL), depositados sobre un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline Transilluminator model TC-312 A, Spectronics Corporation,) y las imágenes fotografiadas mediante un sistema de captación de imágenes (DC290 Zoom Digital Camera, Eastman Kodak Company) (Figura 3.5).

- **Análisis e interpretación:** El tamaño relativo de los fragmentos fue calculado mediante el programa informático 1D Manager versión 2.0 (TDI), y la similitud entre los aislados se calculó según el coeficiente de Dice mediante el programa Lane Manager versión 2.1 (TDI) y el paquete estadístico SPSS 11.0 para Windows, aplicando igualmente el coeficiente de Dice, para la obtención de las matrices y los dendogramas de homología. El criterio seguido para establecer diferencias entre los patrones de AFLP obtenidos, fue considerar que eran aislados iguales aquellos que tenían el mismo número y tamaño de fragmentos, y diferentes aquellos cuyos perfiles diferían en uno o más fragmentos (Gaafar *et al.*, 2003).

- **Estudio del poder discriminatorio de la técnica:** Al igual que en el análisis PFGE, se aplicó el índice de diversidad de Simpson (Hunter & Gaston, 1988; Dillon *et al.*, 1993) para comprobar el poder discriminatorio de los enzimas empleados. Además, este índice fue utilizado para conocer cuál de los dos procedimientos, PFGE y AFLP, era más discriminante.

4 Resultados

4.1 Resultados de la identificación fenotípica.

El estudio de las características morfo-culturales demostró que los aislados clínicos incluidos en el estudio se caracterizaban por: i) ser bacilos ácido-alcohol resistentes de morfotipo celular acebrado; ii) crecer adecuadamente a 37° C en atmósfera convencional, en medios específicos para micobacterias (Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H11 y 7H9), aunque su crecimiento nunca fue ostensible antes de los siete días, y ser incapaces de desarrollarse en medio de MacConkey sin cristal violeta; iii) dar lugar en los medios sólidos a colonias fotocromógenas de morfotipo S/R, cuya pigmentación variaba desde amarillo pálido a amarillo intenso y se intensificaba con el envejecimiento de los cultivos, y en los medios líquidos a un sedimento de color amarillo pajizo (Figura 4.1).

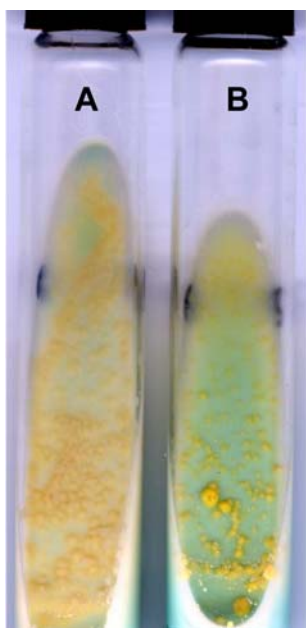


Figura 4.1.- Fotoinducción de un cultivo de *M. kansasii* en medio de Löwenstein-Jensen: A) Cultivo antes de la exposición a la luz; B) Cultivo tras la exposición a la luz. Obsérvese la coloración amarillenta de las colonias del tubo B (cultivo fotocromógeno).

Características que compartían con las cepas control, aunque la fotocromogenicidad de *M. kansasii* genotipo VI, sólo pudo ponerse de manifiesto tras exposición lumínica prolongada (24 horas) y posterior reincubación a 37° C, durante tres días. Las características culturales permitieron la identificación preliminar de los aislados como micobacterias del grupo I de Runyon, y la morfología celular sustentaba su adscripción a la especie *M. kansasii*. Las características bioquímicas básicas, especialmente la

detección de actividades nitrato-reductasa, acumulación de niacina, catalasa termo-resistente e hidrolítica del Tween 80 permitieron, junto con las características morfo-culturales la identificación de los aislados como *M. kansasii* (Tabla 4.1).

Tabla 4.1.- Características culturales y bioquímicas de los aislados y cepa control estudiados.

Característica	Aislados clínicos	<i>M. kansasii</i> CECT 3030	Característica	Aislados clínicos	<i>M. kansasii</i> CECT 3030
Crecimiento >7 días	100%	+	Acumulación de niacina	0%	-
Morfología celular acebrada	100%	+	Catalasa a 68°C	100%	+
Colonias SR	100%	+	Hidrólisis del Tween 80	97,1%	+
Fotocromogenicidad	100%	+	Reducción del telurito	100%	+
Crecimiento en MacConkey	0%	-	Pirazinamidasas	0%	-
Nitratasa	100%	+			

Los resultados obtenidos demostraron la gran homogeneidad fenotípica de los aislados estudiados, ya que el 97,1% presentaron un perfil común. Los tres aislados (2,9%) que mostraron actividad catalasa termo-resistente, nitrato-reductasa y reductora del telurito, pero que carecían de actividad Tween 80-hidrolítica, fueron incluidos en el biotipo 2 de la clasificación descrita por el grupo GEMKA y los restantes (97,1%) se incluyeron en el biotipo 1 (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.- Biotipos detectados según el esquema del grupo GEMKA^a.

Biotipo	Característica				Aislados clínicos	
	Nitratasa	Catalasa 68°C	Hidrólisis Tween 80	Reducción del telurito	Nº casos	%
1	+	+	+	+	100 / 103	97,1%
2	+	+	-	+	3 / 103	2,9%

^a Calatayud *et al.* (2004)

Los aislados seleccionados para el estudio de actividades enzimáticas mediante la galería bioquímica api[®] ZYM, pertenecían al biotipo 1 del esquema de Calatayud *et al.* (2004). Los resultados obtenidos están recogidos en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Actividades enzimáticas detectadas mediante el sistema api[®] ZYM.

Actividad	Aislados de pacientes		Actividad	Aislados de pacientes	
	VIH -	VIH +		VIH -	VIH +
Fosfatasa alcalina	11/11	5/5	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	11/11	5/5
C4 esterasa	11/11	5/5	α - galactosidasa	0/11	0/5
C8 esterasa lipasa	11/11	5/5	β - galactosidasa	0/11	0/5
C14 lipasa	11/11	5/5	β - glucoronidasa	0/11	0/5
Leucina arilamidasa	11/11	5/5	α - glucosidasa	9/11	5/5
Valina arilamidasa	5/11	4/5	β - glucosidasa	8/11	5/5
Cistina arilamidasa	11/11	5/5	N-acetil- β -glucosaminidasa	6/11	3/5
Tripsina	3/11	4/5	α - manosidasa	0/11	0/5
α - quimotripsina	2/11	3/5	α -fucosidasa	10/11	1/5
Fosfatasa ácida	11/11	5/5			

La actividad α -fucosidasa permitió la inclusión de los aislados en dos de los biotipos de Tortoli *et al.* (1994b), 11 de ellos (68,7%) caracterizados por poseer dicha actividad fueron identificados como pertenecientes al biotipo 1 y los restantes como biotipo 2 (Tabla 4.4; Figura 4.2). El análisis estadístico demostró la existencia de una asociación significativa entre los aislados obtenidos de pacientes VIH positivos y la pertenencia a este último biotipo (prueba exacta de Fisher $p < 0,013$).

Tabla 4.4.- Biotipos detectados según el esquema de Tortoli *et al.* (1994b).

Biotipo	Característica		Aislados clínicos	
	α -fucosidasa	Fosfatasa alcalina	Nº de casos	%
1	+	+	11	68,7
2	-	+	5	31,3

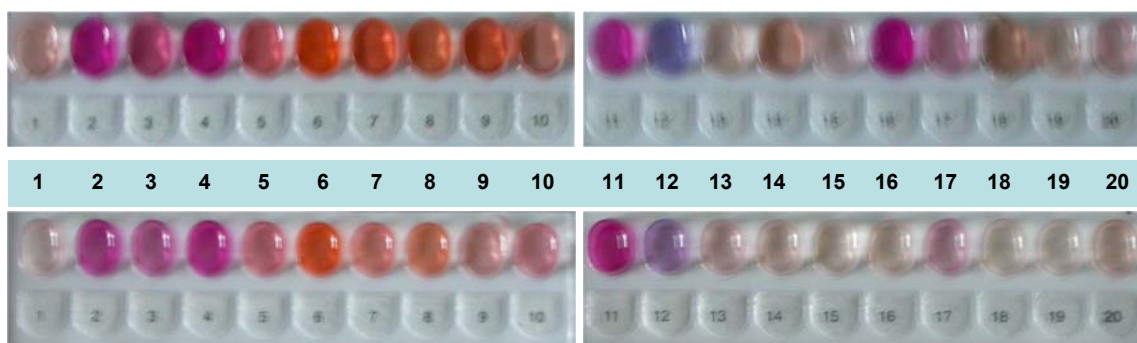
Aislado 1**Aislado 2**

Figura 4.2.- Galería api[®] ZYM correspondiente a dos aislados. En la posición 20 (α -fucosidasa) del aislado 1, se observa una reacción positiva y en el aislado 2 una reacción negativa.

4.2 Resultados sobre la identificación molecular.

Los 103 aislados clínicos y la cepa control *M. kansasii* CECT 3030 hibridaron con la sonda de DNA específica de *M. kansasii* (Accuprobe[®] Gen-Probe Inc), lo que permitió corroborar los resultados de la identificación fenotípica. Sin embargo, dicha sonda no hibridó con la cepa *M. kansasii* genotipo VI (Tabla 4.5).

La amplificación de la región intergénica espaciadora del rRNA 16S-23S del ensayo INNO-LiPA, permitió la obtención en todos los casos de un único amplicón de 400 a 550 pb, que era el tamaño esperado (Figura 4.3).

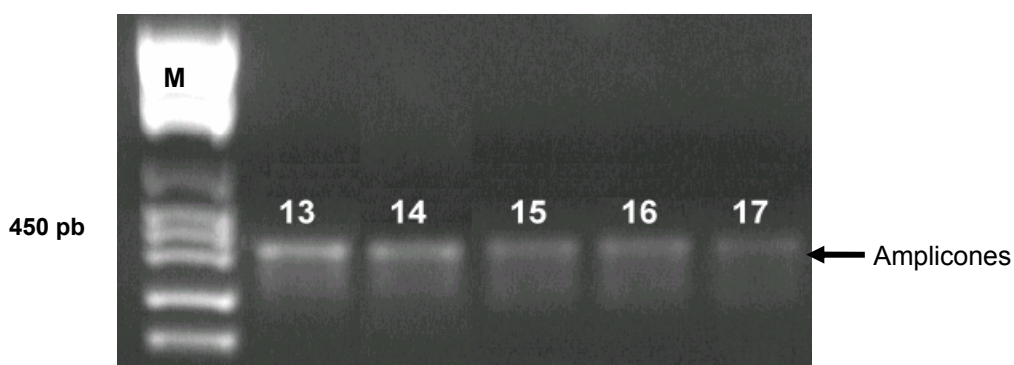


Figura 4.3.- Resultados de la amplificación del ensayo INNO-LiPA[®]. Carrera M: marcador de peso molecular; Carreras 13 a 17: amplicones.

La hibridación inversa del ensayo INNO-LiPA[®] permitió constatar que los aislados clínicos y la cepa control *M. kansasii* CECT 3030 hibridaban con las sondas 1 (control de conjugado), 2 (específica de género *Mycobacterium*) y 4 (MKA 1, específica de *M. kansasii* grupo 1), lo cuál permitió su identificación como *M. kansasii* genotipo I. Sin embargo, la cepa *M. kansasii* genotipo VI lo hizo con las sondas 1, 2 y 6 (MKA 3), correspondiente esta última a *M. kansasii* genotipos III a V y *M. gastri* (Tabla 4.5).

Tabla 4.5.- Resultados de la identificación molecular.

Organismo	Gen-Probe <i>M. kansasii</i>	Hibridación reversa (INNO-LiPA)					Identificación
		Sonda 1 ^a	Sonda 2 ^b	Sonda 4 ^c	Sonda 5 ^d	Sonda 6 ^e	
Aislados clínicos	+ (100%)	+	+	+	-	-	<i>M. kansasii</i> genotipo I
<i>M. kansasii</i> CECT 3030	+	+	+	+	-	-	<i>M. kansasii</i> genotipo I
<i>M. kansasii</i> genotipo VI	-	+	+	-	-	+	<i>M. kansasii</i> genotipo III a V <i>M. gastri</i>

^a: control de conjugado; ^b: específica de género *Mycobacterium*; ^c: específica de *M. kansasii* genotipo I; ^d: específica de *M. kansasii* genotipo II; ^e: específica de *M. kansasii* genotipos III a V y de *M. gastri*.

4.3 Resultados del estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.

Los ensayos preliminares, encaminados a comprobar la eficacia de la resazurina en la interpretación de los resultados, demostraron la ausencia de diferencias significativas intra e inter-ensayo, y que su interpretación era más fácil cuando se realizaba con resazurina (Figura 4.4).

La cepa control *M. kansasii* CECT 3030 presentó un perfil de sensibilidad concordante con el informado por la Colección Española de Cultivos Tipo, siendo sensible a isoniazida (CMI: 1 mg/L), rifampicina (CMI: 0,125 mg/L) y etambutol (CMI: 2,5 mg/L), y resistente a estreptomina (CMI: \geq 32 mg/L). Con respecto al resto de sustancias estudiadas, presentó resistencia

a enoxacino (CMI: 4 mg/L) y lomefloxacino (CMI: 2 mg/L), y sensibilidad a los otros fármacos. Mientras que *M. kansasii* tipo VI, presentó resistencia a las quinolonas anteriormente mencionadas (enoxacino, CMI: 8 mg/L; lomefloxacino, CMI: 2 mg/L), a kanamicina, neomicina y paromomicina (CMI: \geq 32 mg/L), y al PAS (CMI: 4 mg/L).

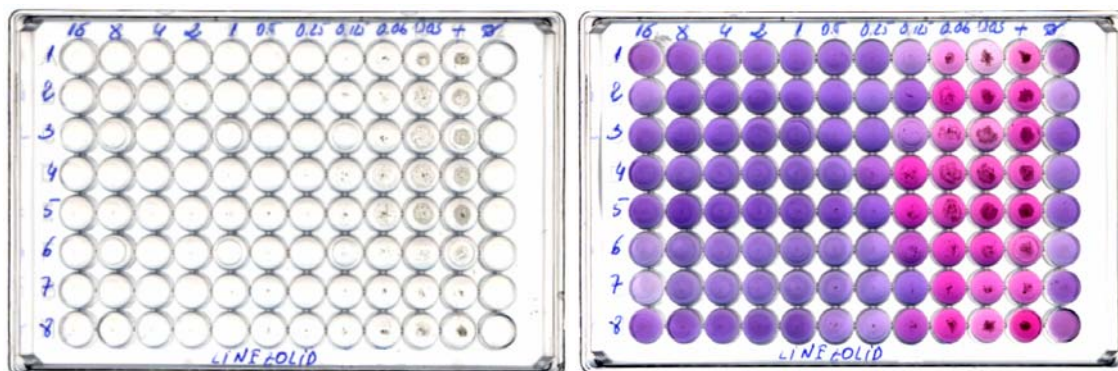


Figura 4.4.- Estudio de sensibilidad mediante microdilución. Se muestra un ensayo sin resazurina y otro con resazurina, evidenciándose la fácil lectura de éste último.

Los resultados de las CMI's obtenidas mediante el método de microdilución frente a los 103 aislados, las CMI₅₀ y CMI₉₀, y la proporción de aislados resistentes, están recogidos en las tablas 4.6 y 4.7, respectivamente.

Los fármacos empleados en el tratamiento habitual de las infecciones producidas por *M. kansasii*, isoniazida, rifampicina y etambutol, mostraron buena actividad. En el caso de la isoniazida, el rango de la CMI varió entre 0,125 mg/L y 4 mg/L, y las CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron de 2 mg/L y 4 mg/L, respectivamente. La rifampicina inhibió a los aislados a concentraciones entre \leq 0,06 mg/L y 2 mg/L, con CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0,125 mg/L y 0,25 mg/L; mientras que el rango de las CMI para etambutol varió entre 0,5 y 8 mg/L, y las CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron de 4 mg/L. De modo, que todos los aislados ensayados resultaron sensibles a isoniazida, ya que fueron inhibidos con concentraciones inferiores al punto de corte recomendado por CLSI; tres de ellos (2,9%) mostraron resistencia a etambutol y uno (0,9%) a rifampicina (Tablas 4.6 y 4.7).

La CMI de los aislados que mostraron resistencia a rifampicina y etambutol fue de 2 mg/L y 5 mg/L, respectivamente; concentraciones muy próximas en ambos casos al punto de corte establecido para estos antibióticos.

Entre los aminoglucósidos, la estreptomina y la amikacina mostraron muy buena actividad con CMI₅₀ y CMI₉₀, en ambos casos, de 1 mg/L y 4 mg/L, respectivamente; de modo que todos los aislados fueron considerados como sensibles (Tablas 4.6 y 4.7).

Tabla 4.6.- Resultados de los estudios de sensibilidad mediante microdilución en medio líquido.

Compuesto	CMI mg/L(% acumulado)									
	≤0,06	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	≥32,0
Estreptomina				1,9	52,4	87,4	100			
Etambutol				1,9	2,9	44,7	97,1	100		
Isoniazida		0,9	1,9	13,6	35,0	73,8	100			
PAS			1,0		11,7	26,2	72,8	96,1	97,1	100
Rifampicina	39,8	68,9	97,1	99,0		100				
Amikacina		2,9	11,7	30,1	63,1	79,6	97,1	99	100	
Kanamicina				2,9	14,6	51,5	79,6	95,1	100	
Neomicina			0,9		2,9	8,7	52,4	93,2	100	
Paromomicina					8,7	44,7	87,4	97,1	98,1	100
Azitromicina		2,9	16,5	59,2	91,3	95,1	99,0	100		
Claritromicina	89,3	93,2	96,1	100						
Clofazimina	71,8	90,3	95,1	98,1	100					
Linezolid		5,8	25,2	63,1	90,2	96,1	100			
Ciprofloxacino	0,9	1,9	4,9	42,7	83,5	95,1	96,1	98,1	100	
Enoxacino					1,9	7,8	34,0	91,3	99,0	100
Enrofloxacin	26,4	91,3	93,2	95,1	98,1	100				
Lomefloxacino				5,8	18,4	68,9	85,4	96,1	97,1	100
Moxifloxacino	61,2	91,2	95,1	97,1	100					
Rifabutina	88,3	92,2	94,2	98,1	100					
Benzalconio			1,9	10,7	22,3	39,8	92,2	100		
Trifluoperazina			1,9	7,8	17,5	31,1	68,0	89,3	97,1	100

La CMI₉₀ de kanamicina y neomicina fue de 8 mg/L para ambos antibióticos y la proporción de aislados resistentes detectada fue del 20,4% y del 47,6%, respectivamente. El rango de la CMI para la paromomicina varió entre 1 mg/L y ≥ 32 mg/L, y la CMI₉₀ fue de 8 mg/L; de modo que si consideramos el mismo punto de corte de la neomicina por tratarse de un antibiótico de estructura química similar (pseudotetrasacárido: aminociclitol 2-desoxiestreptamina), la proporción de aislados resistentes sería del 12,6% (Tablas 4.6 y 4.7).

Entre las quinolonas observamos resultados dispares dependiendo del grupo al que pertenecen, siendo *in vitro* más activas las de cuarta generación, las 8-metoxifluoroquinolonas, representadas en este estudio por moxifloxacino, que las restantes moléculas estudiadas; para este antibiótico, el rango de las CMI estuvo comprendido entre $\leq 0,06$ mg/L y 1 mg/L, la CMI₉₀ fue de 0,125 mg/L, y no detectamos aislados resistentes. En el caso de las quinolonas de segunda generación, enoxacino y lomefloxacino, el rango de las CMI varió entre 1 y ≥ 32 mg/L, y 0,5 y ≥ 32 mg/L, respectivamente. En ambos casos, la CMI₉₀ fue de 8 mg/L, y la proporción de aislados resistentes fue de 98,1% y 81,6%, respectivamente. De las quinolonas de tercera generación ensayadas, enrofloxacino fue más activo que ciprofloxacino con CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0,125 mg/L y un 1,9% de aislados resistentes, frente al 16,5% de resistencias que obtuvimos en el caso de ciprofloxacino (Tablas 4.6 y 4.7).

Los macrólidos estudiados, azitromicina y claritromicina, mostraron una gran actividad *in vitro*, ninguno de los aislados fue resistente a estos antibióticos, y la CMI₉₀ fue de 1mg/L y 0,125 mg/L, respectivamente (Tablas 4.6 y 4.7).

El rango de inhibición del PAS varió entre 0,25 mg/L y ≥ 32 mg/L, la CMI₉₀ fue de 8 mg/L y el porcentaje de resistencias del 88,3%. La proporción de aislados resistentes a clofazimina fue del 4,9%, su rango inhibitorio estuvo comprendido entre $\leq 0,06$ a 1 mg/L, y su CMI₉₀ de 0,125 mg/L (Tablas 4.6 y 4.7).

Tabla 4.7.- Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos mediante microdilución. Punto de corte de cada compuesto y porcentaje de aislados resistentes.

Compuesto	CMI mg/L				
	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Punto de Corte	% aislados resistentes
Estreptomicina	0,5 a 4	1	4	≥ 10 ^a	0
Etambutol	0,5 a 8	4	4	≥ 5 ^a	2,9
Isoniazida	0,125 a 4	2	4	≥ 5 ^a	0
PAS	0,25 a ≥ 32	4	8	≥ 2 ^a	88,3
Rifampicina	≤ 0,06 a 2	0,125	0,25	≥ 1 ^a	0,9
Amikacina	0,125 a 16	1	4	≥ 32 ^a	0
Kanamicina	0,5 a 16	2	8	≥ 5 ^a	20,4
Neomicina	0,25 a 16	4	8	≥ 5 ^{b, c}	47,6
Paromomicina	1 a ≥ 32	4	8	–	–
Azitromicina	0,125 a 8	0,5	1	≥ 16 ^a	0
Claritromicina*	≤ 0,06 a 0,5	≤ 0,06	0,125	≥ 16 ^{a, d}	0
Clofazimina	≤ 0,06 a 1	≤ 0,06	0,125	≥ 0,5 ^b	4,9
Linezolid	0,125 a 4	0,5	1	≥ 32 ^{a, e}	0
Ciprofloxacino**	≤ 0,06 a 16	1	2	≥ 2 ^a	16,5
Enoxacino	1 a ≥ 32	8	8	≥ 2 ^a	98,1
Enrofloxacino	≤ 0,06 a 2	0,125	0,125	≥ 2 ^a	1,9
Lomefloxacino	0,5 a ≥ 32	2	8	≥ 2 ^a	81,6
Moxifloxacino	≤ 0,06 a 1	≤ 0,06	0,125	≥ 4 ^f	0
Rifabutina	≤ 0,06 a 1	≤ 0,06	0,125	≥ 2 ^a	0
Benzalconio	0,25 a 8	4	4	–	–
Trifluoroperazina	0,25 a ≥ 32	4	16	–	–

^a CLSI (NCCLS, 2003); ^b Heifets, 1996; ^c Pérez *et al.*, 1999; ^d Biehle & Cavalieri, 1992; ^e Brown-Elliott *et al.*, 2003; ^f Gillespie & Billington, 1999; * Clase representativa de los nuevos macrólidos; ** Clase representativa de las viejas fluoroquinolonas (entre las que incluimos, enoxacino, lomefloxacino y el enrofloxacino que es un derivado del ciprofloxacino), pero no tan activo *in vitro* como las nuevas 8-metoxifluoroquinolonas.

A diferencia de lo que sucedió con la rifampicina, antibiótico para el que un aislado presentó resistencia con CMI de 2 mg/L, todos ellos fueron uniformemente sensibles a la rifabutina, con CMI₅₀ de ≤ 0,06 mg/L y CMI₉₀ de 0,125 mg/L. Linezolid fue activo frente a todos los aislados, ya que fueron inhibidos por concentraciones inferiores al punto de corte establecido para las

micobacterias. El rango de CMI estuvo comprendido entre 0,125 mg/L y 4 mg/L, y las CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron de 0,5 mg/L y 1 mg/L, respectivamente (Tablas 4.6 y 4.7).

Finalmente, resta comentar, el perfil de sensibilidad que presentaron las cepas frente a las dos sustancias no antibióticas estudiadas, benzalconio y trifluoroperazina; aunque no disponemos de puntos de corte, mostraron actividad *in vitro* frente a *M. kansasii* con CMI₉₀ de 4 mg/L en el caso del benzalconio y CMI₉₀ de 16 mg/L en el de la trifluoroperazina (Tablas 4.6 y 4.7).

4.4 Resultados de la evaluación del sistema Bactec[®] MGIT 960 para los estudios de sensibilidad.

Los resultados obtenidos en el estudio de la cepa control *M. kansasii* CECT 3030 mediante el método de microdilución, que se realizó en paralelo con el ensayo del sistema Bactec[®] MGIT 960, coincidieron con los resultados comentados en el punto anterior (isoniazida, CMI: 1 mg/L; rifampicina, CMI: 0,125 mg/L; etambutol, CMI: 2,5 mg/L; estreptomicina, CMI: ≥ 32 mg/L). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos con el sistema Bactec[®] MGIT 960 (estreptomicina, >10 mg/L; isoniazida, <5 mg/L; rifampicina, <1 mg/L; etambutol, <5 mg/L) (Figura 4.5).

El estudio de sensibilidad mediante el método de microdilución, tuvo que repetirse en el caso de cinco aislados, puesto que se objetivó al realizar la lectura, la existencia de contaminación bacteriana. En general, podemos decir que todos los fármacos mostraron una buena actividad *in vitro* frente a los 73 aislados clínicos estudiados, siendo todos ellos sensibles a la isoniazida y a la estreptomicina, con una CMI₉₀ de 4 mg/L y 2 mg/L, respectivamente. Del mismo modo, la CMI₅₀ y CMI₉₀ de la rifampicina fue de 0,125 y 0,25 mg/L, respectivamente, con una proporción de aislados resistentes del 1,4%. En el caso del etambutol, la CMI₅₀ y CMI₉₀ fue de 2 mg/L y 4 mg/L, respectivamente, siendo el porcentaje de aislados resistentes del 4,1% (Tabla 4.8).

El estudio de sensibilidad mediante SIRE-MK se repitió en cinco

aislados: en cuatro casos debido al sobrecrecimiento de los tubos, que habían sido inoculados tras 3-5 días de incubación de la suspensión micobacteriana, y en un caso debido a la contaminación bacteriana del tubo control del ensayo. Con esta técnica, todos los aislados fueron sensibles a etambutol, rifampicina y estreptomycin, y uno de ellos (1,4%) fue resistente a isoniazida (Figura 4.5).

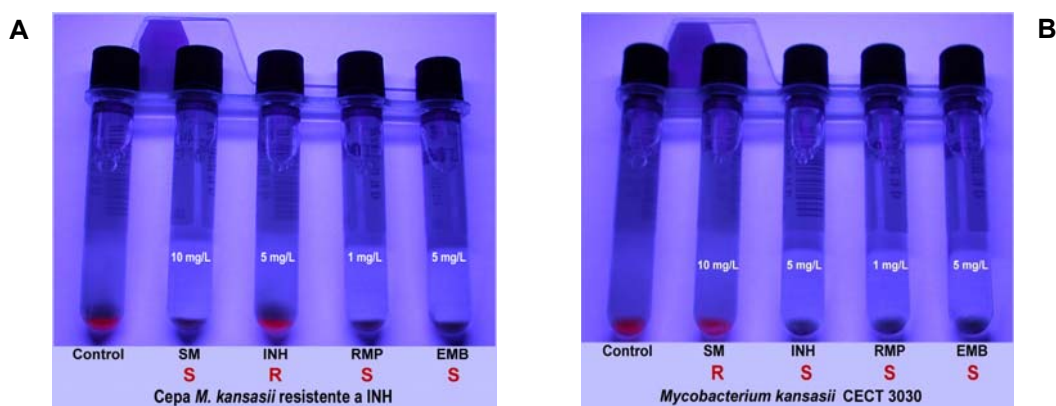


Figura 4.5.- A: Cepa resistente a la isoniazida. B: Resultado de la cepa control con el sistema Bactec MGIT 960.

Tabla 4.8.- Resultados de los estudios de sensibilidad mediante microdilución en medio líquido de los aislados incluidos en el estudio comparativo con el Sistema Bactec MGIT 960.

Compuesto	Punto de corte (mg/L) ^a	CMI mg/L (% acumulado)								CMI ₅₀ mg/L	CMI ₉₀ mg/L	Aislados resistentes	
		≤0,06	0,12	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0			Nº	%
		Estreptomycin	10					53,4	91,7				
Etambutol	5				4,1		50,7	95,9	100	2	4	3	4,1
Isoniazida	5				12,3	31,5	65,7	100		2	4	0	0
Rifampicina	1	47,9	83,5	94,5	98,6		100			0,125	0,25	1	1,4

a: CLSI (NCLS 2003)

El tiempo que tardó el Sistema Bactec[®] MGIT 960 en informar sus resultados osciló entre 4,1 y 7,2 días, siendo la mediana y la moda del intervalo de 5,9 y 6,8 días, respectivamente; por lo tanto, en todos los casos el tiempo que tardó el estudio de sensibilidad en ser leído fue inferior al número de días requerido en el caso del método de microdilución.

De los 292 ensayos realizados mediante el sistema automatizado Bactec[®] MGIT 960, el porcentaje de concordancia con el método de microdilución fue del 98,3%, variando entre un 95,9% para el etambutol y un 100% para estreptomycin (Tabla 4.9).

Tabla 4.9.- Resultados de sensibilidad y porcentaje de concordancia entre ambos métodos.

Antibiótico	Interpretación de los resultados								Porcentaje de concordancia
	CMI		MGIT		CMI		MGIT		
	S	S	R	S	S	R	R	R	
Estreptomycin	73		0		0		0		100
Etambutol	70		3		0		0		95,9
Isoniazida	72		0		1		0		98,6
Rifampicina	72		1		0		0		98,6
Total	287		4		1		0		98,3

Al comparar los resultados obtenidos con Bactec[®] MGIT 960 y el método de microdilución, que consideramos como nuestro “*gold standard*”, se encontraron cinco discrepancias que fueron categorizadas como cuatro resultados falsamente sensibles y un resultado falsamente resistente. Los tres resultados falsamente sensibles para el etambutol se detectaron en aislados que habían mostrado por el método de microdilución CMI's de 5 mg/L, que es justo el punto de corte establecido para este microorganismo (NCCLS 2003), y el de la rifampicina tenía una CMI de 2 mg/L, cercana al punto de corte (1mg/L). El resultado falsamente resistente se obtuvo a partir de un aislado con una CMI para la isoniazida de 2,5 mg/L. De modo que la sensibilidad del sistema Bactec MGIT 960 para los ensayos de sensibilidad de *M. kansasii* a los tuberculostáticos de primera línea varió entre el 98,1% y el 100% (Tabla 4.10).

Tabla 4.10.- Valores objetivos obtenidos.

Antibiótico	Valor predictivo positivo	Sensibilidad	Resultados	
			Falsos sensibles	Falsos resistentes
Etambutol	94,4	100	3	0
Isoniazida	100	98,1	0	1
Rifampicina	98,1	100	1	0
Estreptomycin	100	100	0	0

4.5 Resultados del estudio del polimorfismo genético mediante PFGE.

Los resultados obtenidos mediante análisis PFGE fueron decepcionantes debido a la aparición casi constante de un importante *background*, que dificultaba la adecuada visualización de las bandas, y a la degradación espontánea del DNA, que impedía la tipificación de los aislados, a pesar de: i) la adición de thiourea a los tampones usados para la preparación de los bloques de agarosa-biomasa bacteriana y para la separación electroforética; ii) el especial cuidado en la preparación y conservación de los bloques; así como, por la inactividad de los enzimas de restricción utilizados sobre el DNA de algunos aislados (Figura 4.6).

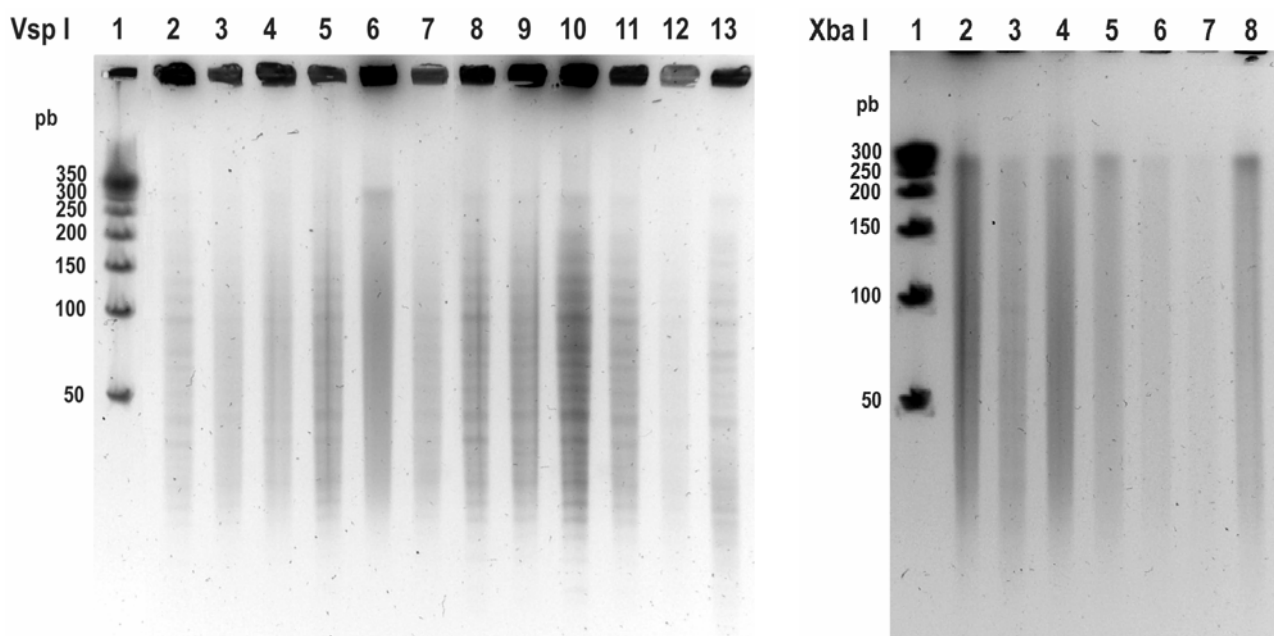


Figura 4.6.- *VspI*: En las carreras 3, 4 y 7 se observa degradación de DNA. En la carrera 6 se observa fallo en la acción del enzima de restricción; *XbaI*: En las carreras 2 a 8 se observa degradación del DNA.

La tipabilidad del enzima de restricción *XbaI* fue del 55,1%, ya que la degradación del DNA impidió la tipificación de 40 (44,9%) de los 89 aislados estudiados, a pesar de que el ensayo PFGE fue repetido en tres ocasiones con bloques diferentes. El análisis de los perfiles de restricción obtenidos con este enzima demostró que los aislados con perfiles interpretables presentaban de 23 a 24 fragmentos de restricción con tamaños moleculares relativos

comprendidos entre 250 pb y menos de 50 pb; once de los cuales, comunes a todos los aislados y con menos de 50 pb de tamaño molecular relativo, no fueron tenidos en cuenta en el análisis del polimorfismo (Figura 4.7).

El análisis comparativo de los perfiles de restricción obtenidos con *Xba*I, atendiendo al número y tamaño de los fragmentos con ≥ 50 pb, demostró la existencia de dos patrones de restricción, a los que denominamos patrones A y B, que se diferenciaban entre sí por la presencia en el patrón B de un fragmento de 62 pb (Figura 4.7).

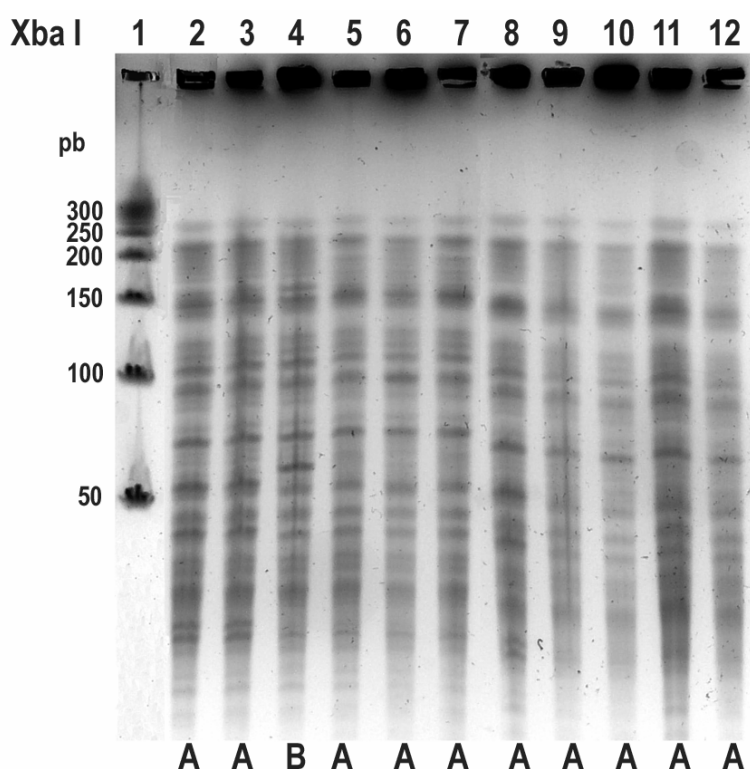


Figura 4.7.- Patrones obtenidos con el enzima *Xba*I.

La cepa control *M. kansasii* CECT 3030 mostró un perfil correspondiente al patrón A. El patrón A, caracterizado por la ausencia del fragmento de 62 pb, incluía a 47 (95,9%) de los 49 aislados clínicos que logramos tipificar; mientras que los dos aislados restantes (4,1%) presentaban el perfil de restricción propio del patrón B.

La tipabilidad del enzima de restricción *VspI* fue del 73%, ya que permitió la tipificación de 65 de los 89 aislados estudiados. Los perfiles de restricción obtenidos demostraron la existencia de 19 fragmentos con tamaños relativos comprendidos entre 300 pb y menos de 50 pb, ocho de los cuales no fueron incluidos en el análisis por tener un tamaño molecular relativo < 50 pb. El estudio comparativo de los electroforegramas permitió constatar que todos los aislados, incluida la cepa control *M. kansasii* CECT 3030, presentaban el mismo patrón de restricción, patrón A (Figura 4.8).

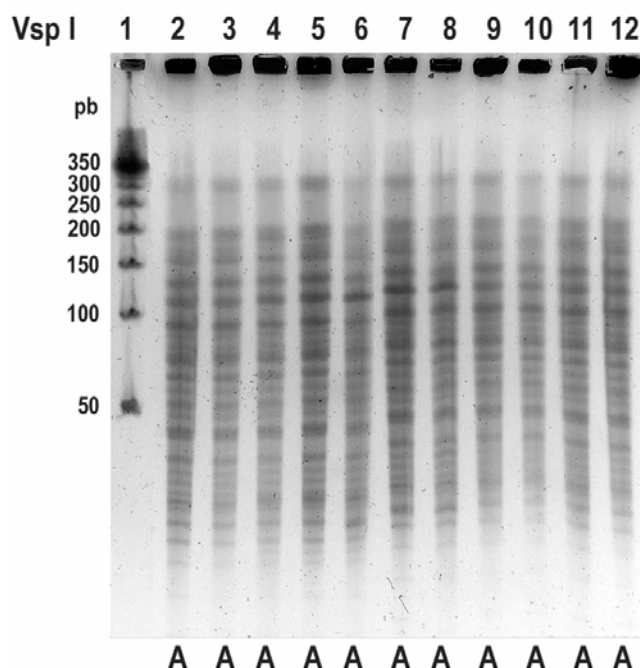


Figura 4.8.- *VspI*: Imagen que muestra el único patrón obtenido.

De modo que según los criterios de Tenover *et al.* (1995) todos los aislados estudiados pertenecen al mismo clon. El poder discriminatorio de la técnica PFGE con cada uno de los enzimas de restricción empleados y cuando se analizaron en conjunto según el índice de Simpson es muy bajo y no significativo si tenemos en cuenta que autores como Hunter & Gaston (1988) consideran que para que una técnica tenga un poder de discriminación aceptable, éste debe alcanzar el 90%.

4.6 Resultados del estudio del polimorfismo genético mediante AFLP.

En algunos aislados las reacciones de amplificación fallaron en repetidas ocasiones, y por lo tanto fue imposible determinar su perfil AFLP. De modo que la tipabilidad de los cebadores utilizados varió entre el 97,1% y el 98,1 % (Tabla 4.11).

Tabla 4.11.- Fracasos de la amplificación.

<i>Primer</i>	Aislados no amplificados	Tipabilidad
Apa-A	MK92-01, MK95-03	98,1%
Apa-C	MK92-01, MK95-03, MK01-15	97,1%
Apa-T	MK92-01, MK95-03, MK01-15	97,1%

En los restantes casos, los perfiles de restricción obtenidos con cada iniciador fueron polimórficos, y su análisis permitió definir patrones de restricción y la agrupación de los aislados atendiendo al grado de homología que tenían entre sí (Figura 4.9).

La cepa *M. kansasii* CECT 3030, que fue utilizada como control en todos los ensayos, y los aislados obtenidos de un mismo paciente, mostraron siempre el mismo perfil de restricción con cada uno de los cebadores utilizados.

Consideramos que la reproductibilidad de la técnica fue del 100%, ya que se seleccionaron 32 cepas aleatoriamente y junto a la cepa control *M. kansasii* CECT 3030 se repitieron los ensayos con cada uno de los cebadores, mostrando en todos los casos el mismo número de fragmentos y siendo agrupadas por tanto dentro del mismo *cluster*.

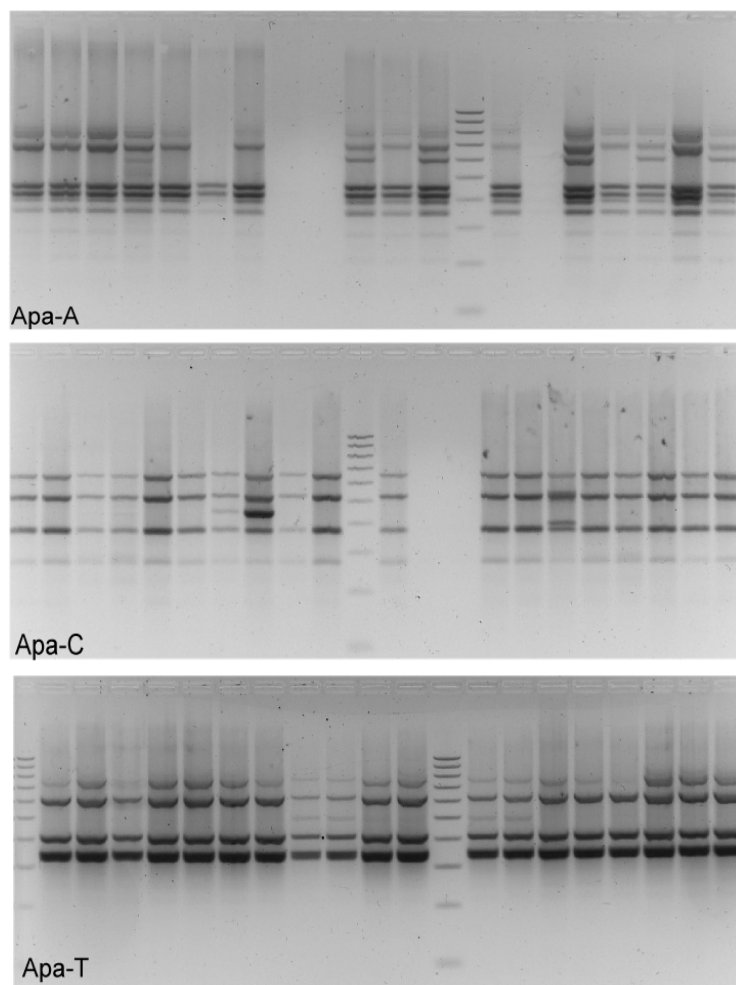


Figura 4.9.- Resultados del análisis mediante AFLP: ejemplo de los patrones de restricción obtenidos con los iniciadores Apa-A, Apa-C y Apa-T.

4.6.1 Resultados obtenidos con el *primer* Apa-A.

Con este iniciador se obtuvieron de cuatro a ocho fragmentos de restricción con tamaños comprendidos entre 275 pb y 750 pb. El análisis de los electroforegramas obtenidos permitió definir cuatro patrones (A1 a A4), de los cuales los más prevalentes fueron los patrones A1 y A2 con 79 y 20 aislados, respectivamente. La cepa control *M. kansasii* CECT 3030, mostró un perfil de restricción que permitió su inclusión en el patrón A2 (Figura 4.10; Tabla 4.12).

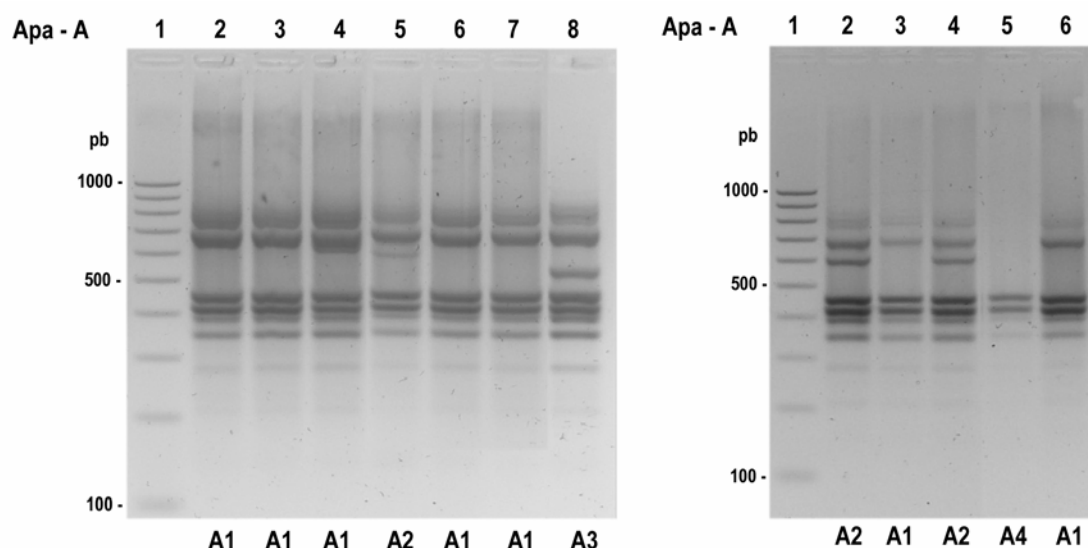


Figura 4.10.- Perfiles de restricción obtenidos con el *primer* Apa-A.

Tabla 4.12.- Patrones obtenidos con el iniciador Apa-A.

Patrón	Fragmentos										Aislados	
	Nº	Tamaño (pb)									Nº	%
		750	650	560	530	425	400	375	350	275		
A1	7	■	■			■	■	■	■	■	79	76,7
A2	8	■	■	■		■	■	■	■	■	20	19,4
A3	8	■	■		■	■	■	■	■	■	1	0,9
A4	4					■	■	■	■		1	0,9
Tipabilidad											101	98,1

■ : presencia de banda

La aplicación del coeficiente de Dice demostró que el grado de similitud entre los aislados incluidos en los diferentes patrones de restricción variaba entre el 66,7% y 93,3% (vg A4 frente A2 y A3; A1 frente a A2 y A3) (Tabla 4.13) y permitió la obtención de los dendogramas de homología representados en las Figuras 4.11 y 4.12.

Tabla 4.13.- Matriz de similitud de los patrones de restricción obtenidos con el *primer Apa-A*.

A1				
A2	0,933			
A3	0,933	0,875		
A4	0,727	0,667	0,667	
	A1	A2	A3	A4

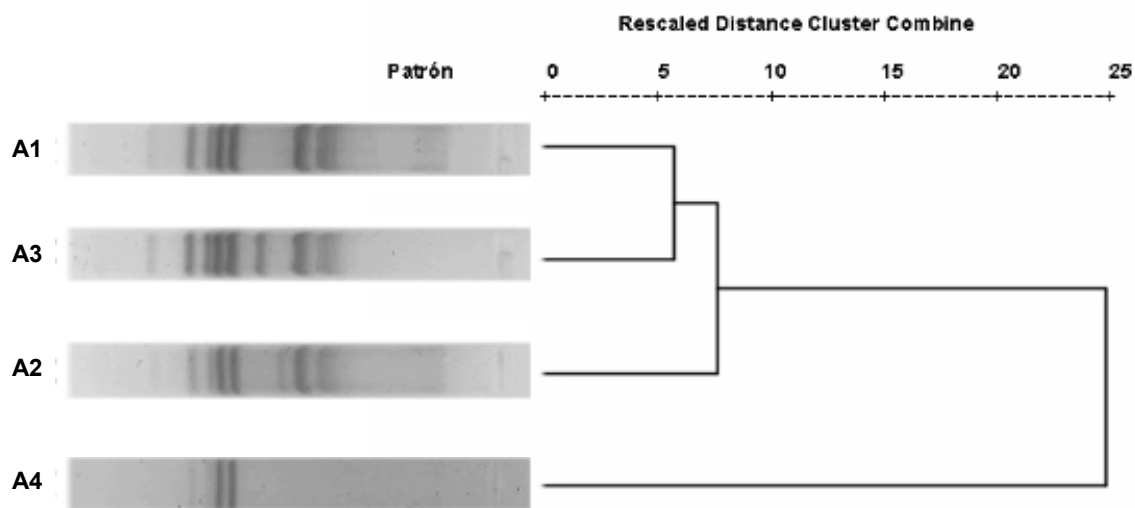


Figura 4.11.- Dendrograma de homología resumido obtenido con el *primer Apa-A*.

Rescaled Distance Cluster Combine

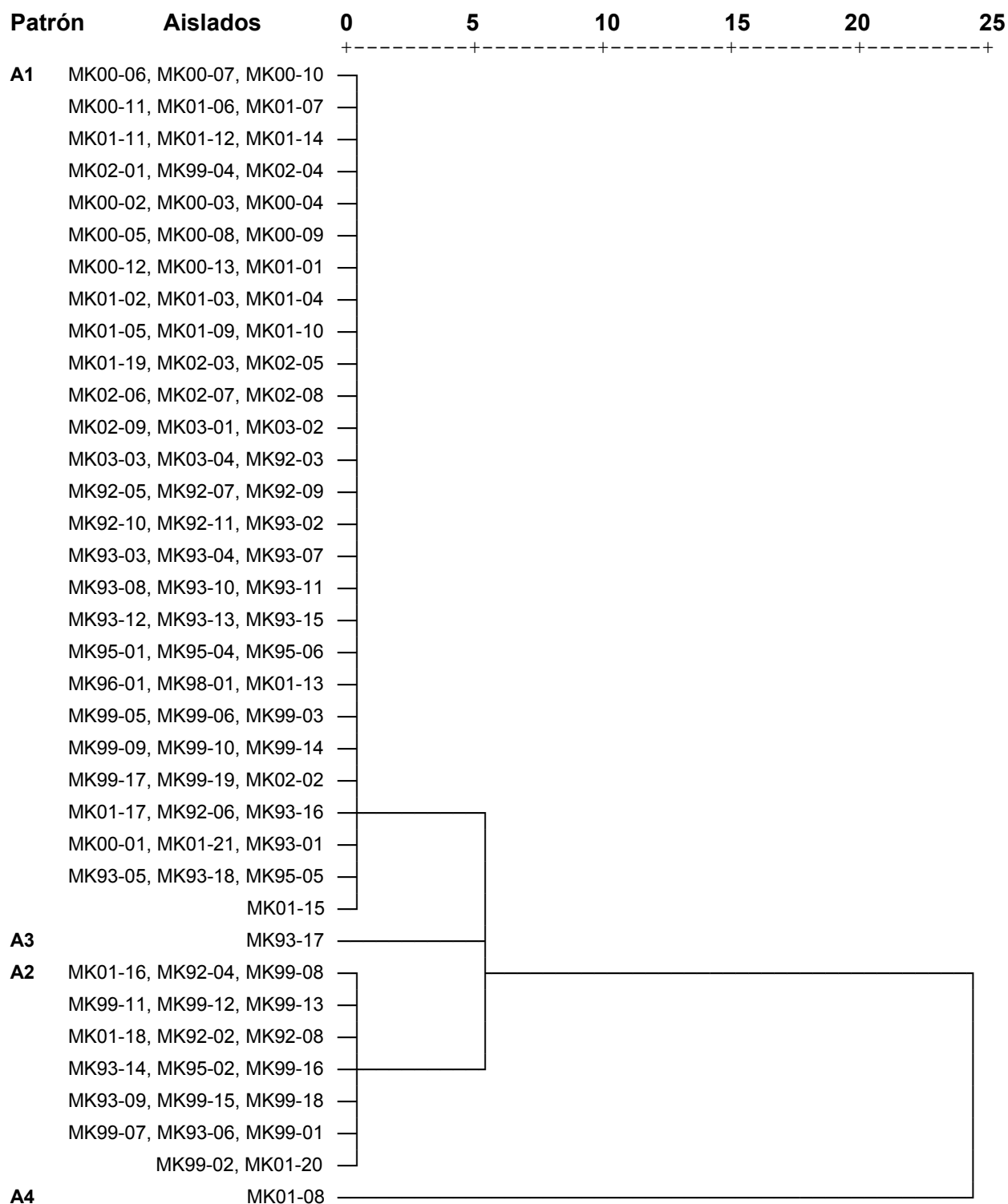


Figura 4.12.- Dendrograma de homología obtenido con el primer Apa-A.

4.6.2 Resultados obtenidos con el *primer* Apa-C.

Este iniciador permitió la detección de seis fragmentos con tamaños relativos comprendidos entre 650 pb y 270 pb (Figura 4.13; Tabla 4.14).

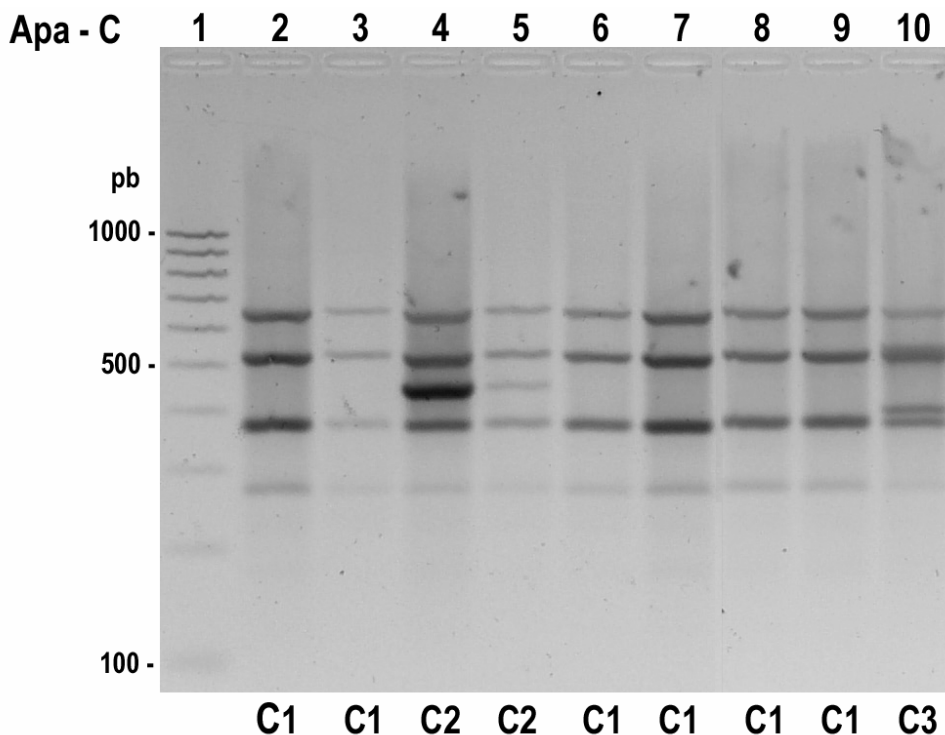


Figura 4.13.- Perfiles de restricción obtenidos con el *primer* Apa-C.

El análisis de los perfiles de restricción obtenidos demostró que cuatro fragmentos, cuyos tamaños eran de 650 pb, 525 pb, 370 pb y 270 pb, estaban presentes en todos los aislados y que las diferencias entre éstos, vinieron determinadas por la presencia o ausencia de los fragmentos de 450 pb y 400 pb; lo cual permitió definir tres patrones de restricción: C1, carente de ambos fragmentos; C2, caracterizado por la presencia del de 450 pb; C3, definido por la presencia del fragmento de 400 pb. El patrón C1 fue el más prevalente, y en él se incluyeron el 94,2% de los aislados y la cepa control *M. kansasii* CECT 3030. En el patrón C2 se incluyeron dos cepas (1,9%) y el patrón C3 estuvo representado por una sola cepa (0,9%) (Tabla 4.14). El índice de similitud entre los aislados varió entre el 80% y el 88,9% (Tabla 4.15; Figuras 4.14 y 4.15).

Tabla 4.14.- Patrones obtenidos con el iniciador Apa-C.

Patrón	Fragmentos							Aislados	
	Nº	Tamaño (pb)						Nº	%
		650	525	450	400	370	270		
C1	4	█	█			█	█	97	94,2
C2	5	█	█	█		█	█	2	1,9
C3	5	█	█		█	█	█	1	0,9
Tipabilidad								100	97,1

█ : presencia de banda

Tabla 4.15.- Matriz de similitud de los patrones de restricción obtenidos con el primer Apa-C.

C1			
C2	0,889		
C3	0,889	0,800	
	C1	C2	C3

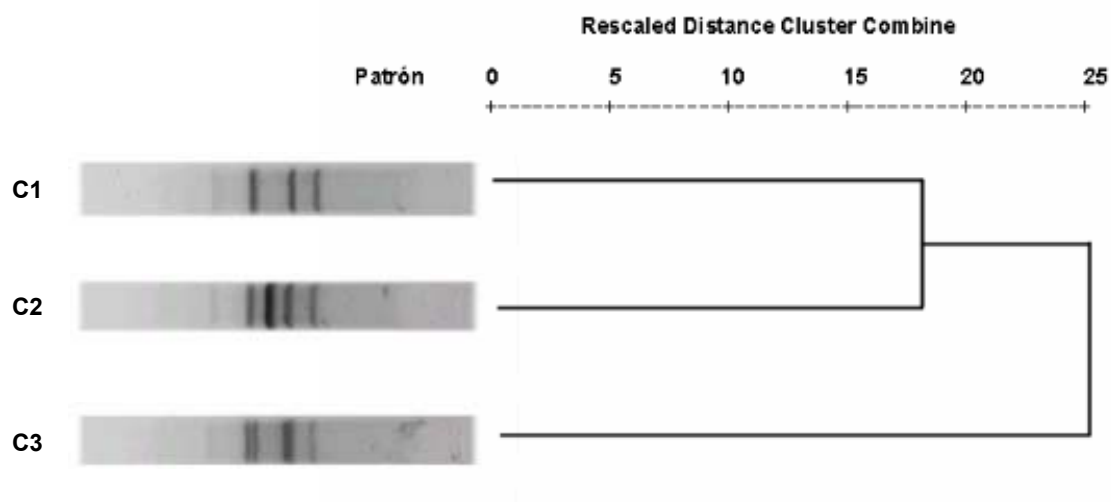


Figura 4.14.- Dendrograma de homología resumido obtenido con el primer Apa-C.

Rescaled Distance Cluster Combine

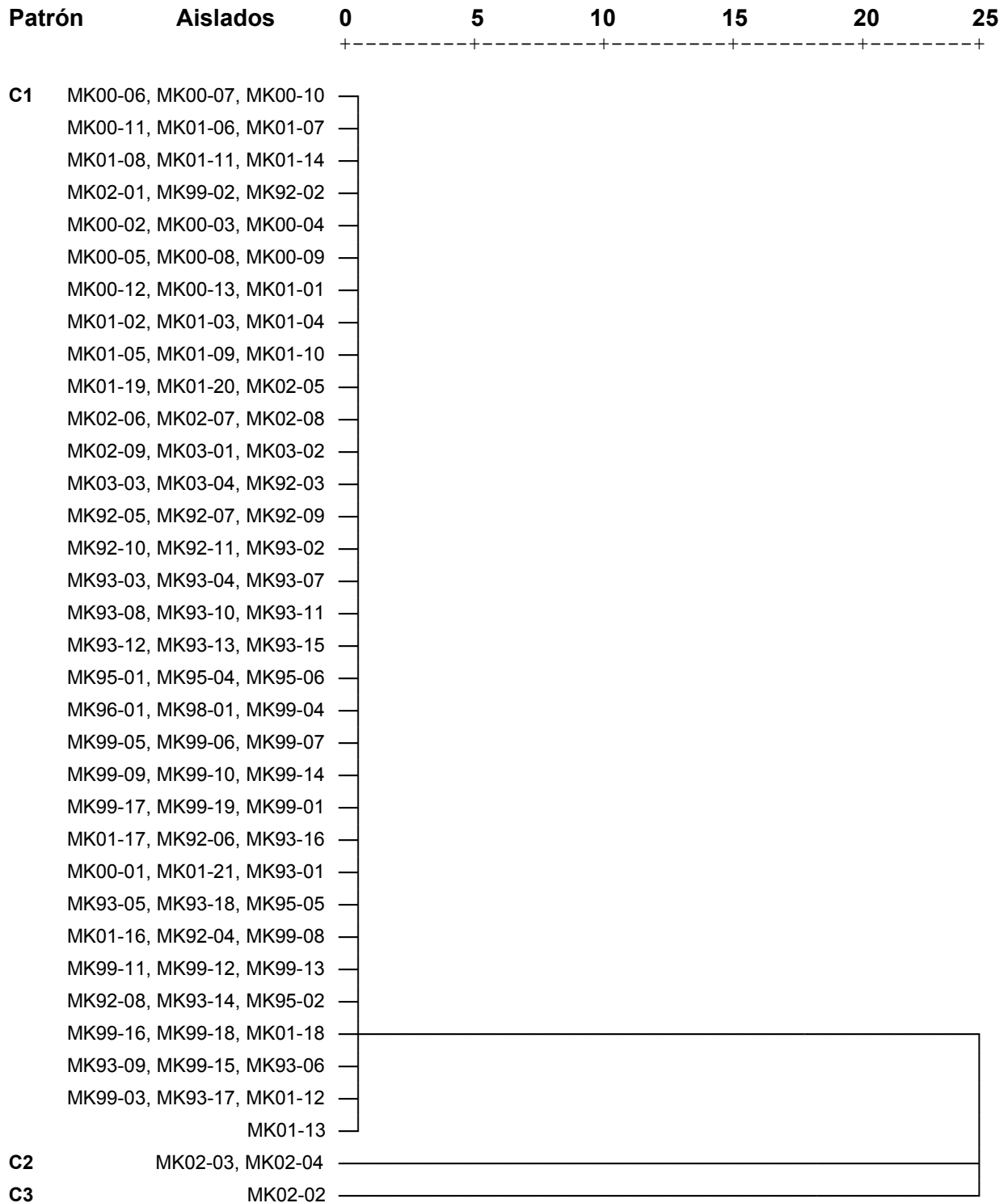


Figura 4.15.- Dendrograma de homología obtenido con el *primer* Apa-C.

4.6.3 Resultados obtenidos con el *primer* Apa-T.

La tipabilidad de la técnica con este *primer* fue del 97,1%, y permitió la detección de ocho fragmentos de restricción con tamaños relativos comprendidos entre 730 pb y 230 pb (Figura 4.16).

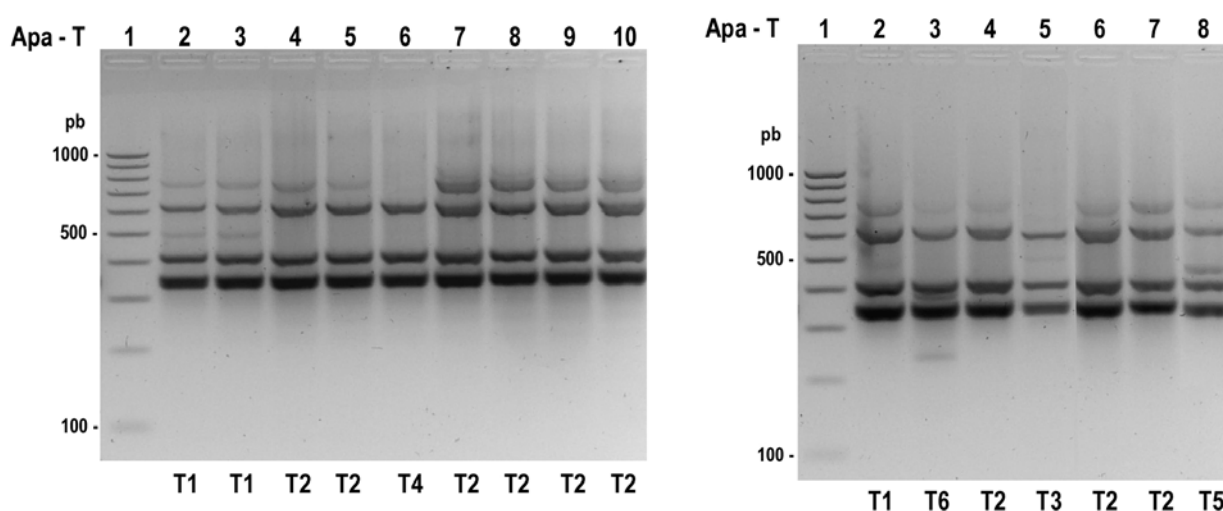


Figura 4.16.- Perfiles de restricción obtenidos con el *primer* Apa-T.

El análisis de los perfiles obtenidos demostró que los aislados presentaban de tres a cinco fragmentos, tres de los cuales con tamaños de 600 pb, 400 pb y 350 pb eran comunes a todos ellos, y permitió definir seis patrones de restricción (T1 a T6) (Figura 4.16; Tabla 4.16).

Tabla 4.16.- Patrones obtenidos con el iniciador Apa-T.

Patrón	Fragmentos								Aislados	
	Nº	Tamaño (pb)							Nº	%
		730	600	500	425	400	350	230		
T1	5	■	■	■		■	■		19	18,4
T2	4	■	■			■	■		64	62,1
T3	4		■	■		■	■		5	4,8
T4	3		■			■	■		9	8,7
T5	5	■	■		■	■	■		2	1,9
T6	5	■	■			■	■	■	1	0,9
Tipabilidad									100	97,1

Los *clusters* más frecuentes eran T2 y T1 que englobaban al 62,1% y al 18,4% de los aislados, respectivamente (tabla 4-16). La cepa control *M. kansasii* CECT 3030, mostró un perfil correspondiente al patrón T2 y los aislados procedentes de un mismo paciente mostraron siempre el mismo patrón de restricción. El índice de Dice demostró que la similitud entre los aislados variaba entre el 66,7% y el 88,9% (Tabla 4.17), y permitió la obtención del dendograma de homología correspondiente (Figuras 4.17 y 4.18).

Tabla 4.17.- Matriz de similitud de los patrones de restricción obtenidos con el *primer* Apa-T.

T1						
T2	0,889					
T3	0,889	0,750				
T4	0,750	0,857	0,857			
T5	0,800	0,889	0,667	0,750		
T6	0,800	0,889	0,667	0,750	0,800	
	T1	T2	T3	T4	T5	T6

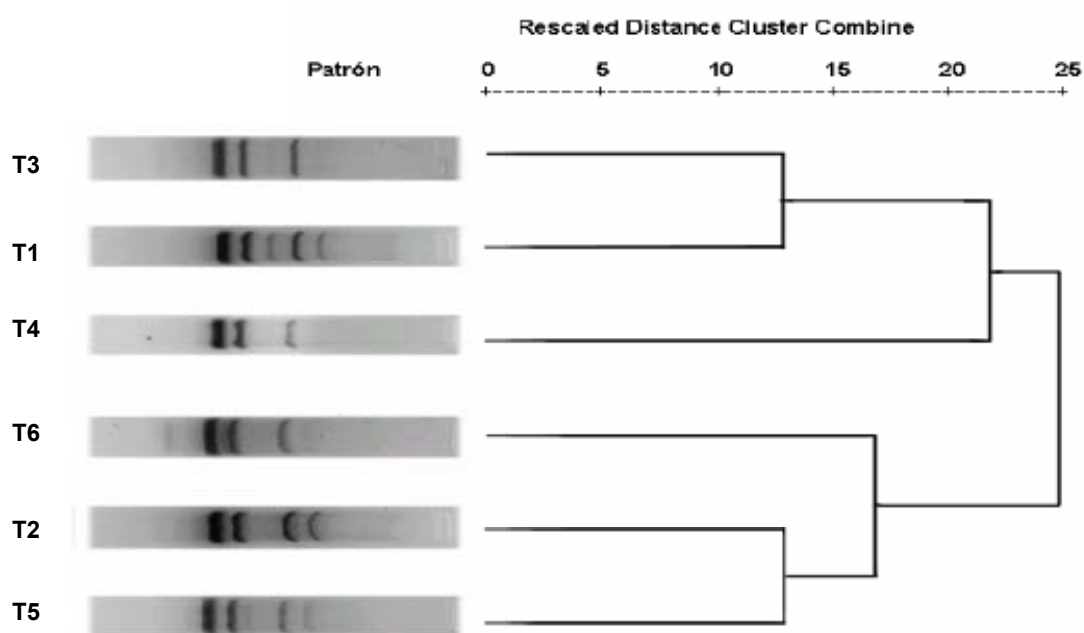


Figura 4.17.- Dendograma de homología resumido obtenido con el *primer* Apa-T.

Rescaled Distance Cluster Combine

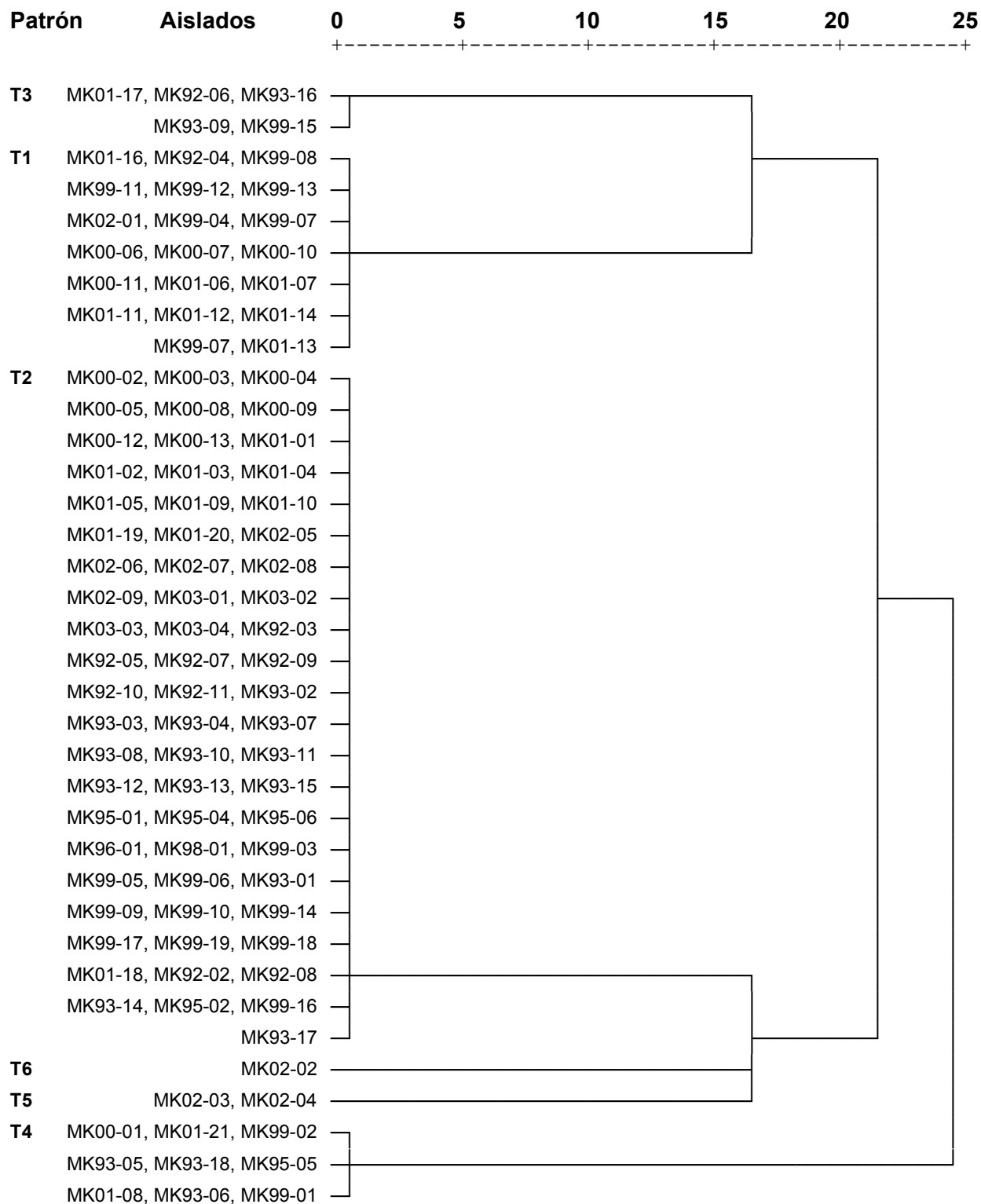


Figura 4.18.- Dendrograma de homología obtenido con el *primer* Apa-T.

4.6.4 Resultados del análisis global.

El análisis conjunto de los resultados obtenidos con los 100 aislados que habían sido tipados con los tres *primers*, demostró la existencia de 12 grupos (*clusters*) que fueron denominados mediante una secuencia numérica representativa de los patrones de restricción que habían generado con cada *primer* (vgr. el cluster 1.1.1, incluye a los aislados con patrones A1, C1 y T1) según los criterios propuestos por Gaafar *et al.* (2003) (Tablas 4-18 y 4-19). La cepa control *M. kansasii* CECT 3030 quedó incluida en el cluster 2.1.2. La homología intra-*clusters* fue en todos los casos del 100%, y la similitud inter-*clusters* varió entre el 78,6% y el 97,0% (Tabla 4.18; Figura 4.19).

Tabla 4.18.- Matriz de similitud global obtenida con los ensayos AFLP.

1.1.1												
1.1.2	0,968											
1.1.3	0,968	0,933										
1.1.4	0,933	0,966	0,966									
1.2.5	0,909	0,938	0,875	0,903								
1.3.6	0,909	0,938	0,875	0,903	0,882							
2.1.1	0,970	0,938	0,938	0,903	0,882	0,882						
2.1.2	0,938	0,968	0,903	0,933	0,909	0,909	0,970					
2.1.3	0,938	0,903	0,968	0,933	0,848	0,848	0,970	0,938				
2.1.4	0,903	0,933	0,933	0,966	0,875	0,875	0,938	0,968	0,968			
3.1.2	0,938	0,968	0,903	0,933	0,909	0,909	0,909	0,938	0,875	0,903		
4.1.4	0,815	0,846	0,846	0,880	0,786	0,786	0,786	0,815	0,815	0,846	0,815	
	1.1.1	1.1.2	1.1.3	1.1.4	1.2.5	1.3.6	2.1.1	2.1.2	2.1.3	2.1.4	3.1.2	4.1.4

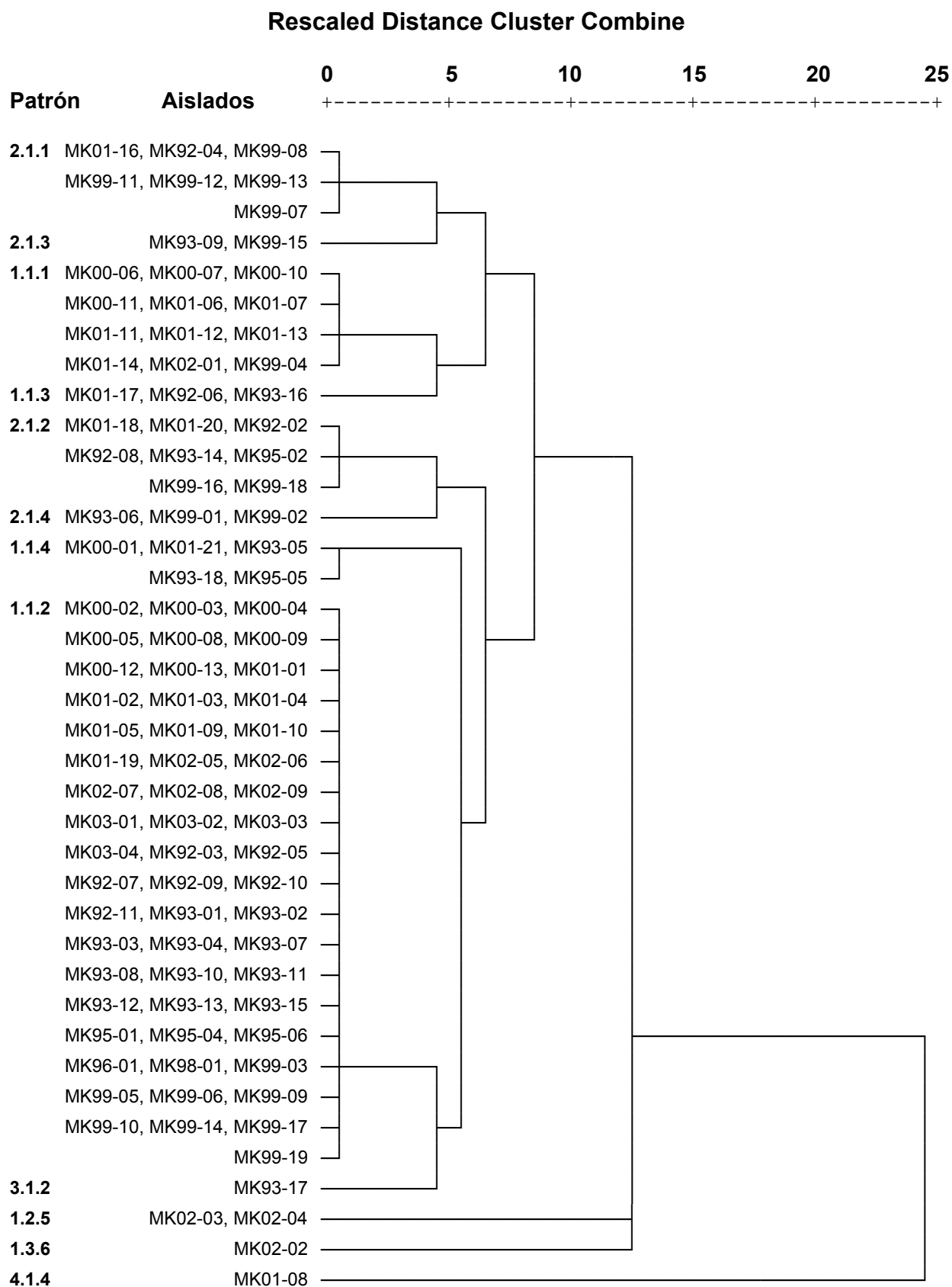


Figura 4.19.- Dendrograma de homología obtenido tras el análisis global.

El *cluster* que incluyó un mayor número de aislados fue el correspondiente al perfil 1.1.2, que englobó el 55 % de los mismos. Le siguieron en frecuencia, aunque con gran diferencia en cuanto al número de cepas, los perfiles 1.1.1, 2.1.2 y 2.1.1 que englobaron el 12,0%, 8,0% y 7,0% de las cepas que pudieron ser tipificadas, respectivamente (Tabla 4.19).

Tabla 4.19.- Clusters AFLP obtenidos mediante el análisis global.

Perfil	Patrones Apa			Aislados				Nº de casos (%)
1.1.1	A1	C1	T1	MK99-04 MK00-11 MK01-12	MK00-06 MK01-06 MK01-13	MK00-07 MK01-07 MK01-14	MK00-10 MK01-11 MK02-01	12,0
1.1.2	A1	C1	T2	MK92-03 MK92-10 MK93-03 MK93-10 MK93-15 MK96-01 MK99-06 MK99-17 MK00-04 MK00-12 MK01-03 MK01-10 MK02-07 MK03-02	MK92-05 MK92-11 MK93-04 MK93-11 MK95-01 MK98-01 MK99-09 MK99-19 MK00-05 MK00-13 MK01-04 MK01-19 MK02-08 MK03-03	MK92-07 MK93-01 MK93-07 MK93-12 MK95-04 MK99-03 MK99-10 MK00-02 MK00-08 MK01-01 MK01-05 MK01-09 MK02-05 MK02-09 MK03-04	MK92-09 MK93-02 MK93-08 MK93-13 MK95-06 MK99-05 MK99-14 MK00-03 MK00-09 MK01-02 MK01-09 MK02-06 MK03-01	55,0
1.1.3	A1	C1	T3	MK92-06	MK93-16	MK01-17		3,0
1.1.4	A1	C1	T4	MK93-05 MK00-01	MK93-18 MK01-21	MK95-05		5,0
1.2.5	A1	C2	T5	MK02-03	MK02-04			2,0
1.3.6	A1	C3	T6	MK02-02				1,0
2.1.1	A2	C1	T1	MK92-04 MK99-12	MK99-07 MK99-13	MK99-08 MK01-16	MK99-11	7,0
2.1.2	A2	C1	T2	MK92-02 MK99-16,	MK92-08 MK99-18	MK93-14 MK01-18	MK95-02 MK01-20	8,0
2.1.3	A2	C1	T3	MK93-09	MK99-15			2,0
2.1.4	A2	C1	T4	MK93-06,	MK99-01	MK99-02		3,0
3.1.2	A3	C1	T2	MK93-17				1,0
4.1.4	A4	C1	T4	MK01-08				1,0

La distribución temporal de los *clusters* permitió constatar que los aislados incluidos en el más prevalente, el *cluster* 1.1.2, se distribuían a lo largo del periodo de estudio con dos picos de mayor incidencia, correspondientes al año 1993 y al trienio 1999-2001, y que en el año 1993 fue en el que se obtuvo un mayor número de *clusters* (10/12). Hubo tres *clusters*, 1.2.5, 1.3.6 y 3.1.2, que aparecieron de modo puntual en años correspondientes al principio del periodo de estudio y el patrón 4.1.4 se dio de forma aislada en el año 2001 (Figura 4.20).

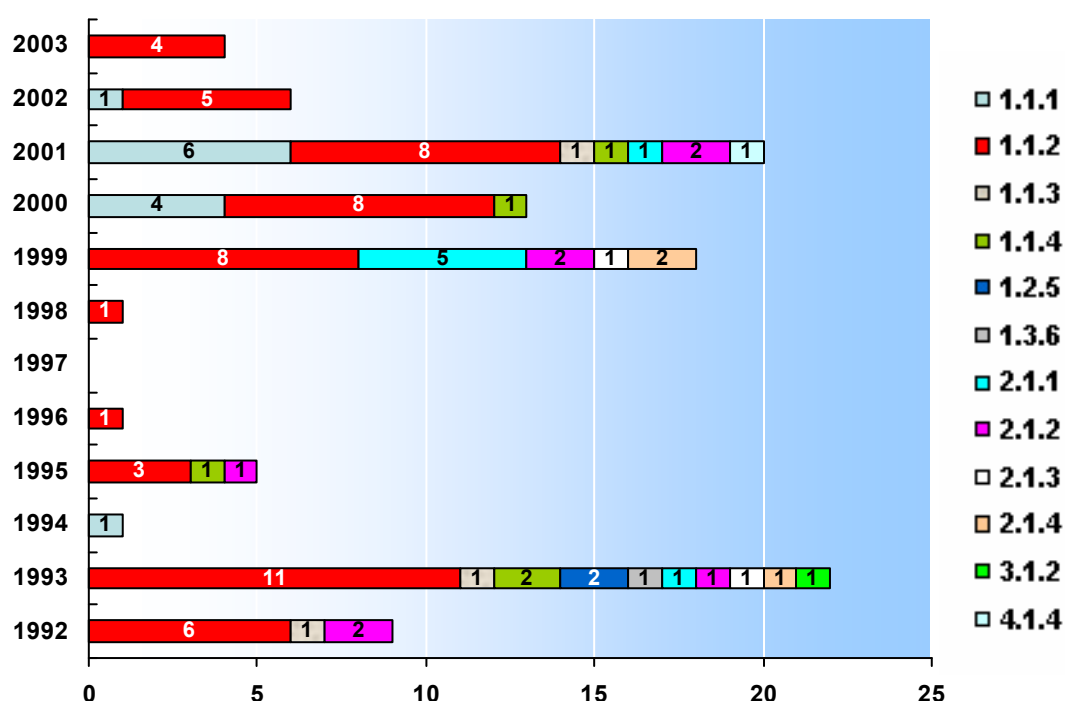


Figura 4.20.- Distribución temporal de los *clusters* obtenidos con AFLP.

La distribución geográfica de los diferentes *clusters* mostró que el más prevalente, el *cluster* 1.1.2, fue hallado en todos los Departamentos de Salud excepto en los Departamentos 10 y 14, y que el *cluster* 1.1.1 sólo fue detectado en los Departamentos 5, 9, 10 y 12. El análisis comparativo de los *clusters* observados en los Departamentos de Salud que aportaron un mayor número de aislados, los Departamentos 5 y 9, indicó su desigual distribución ya que si bien los más prevalentes, los *clusters* 1.1.2 y 1.1.1, fueron detectados en

ambos, algunos de ellos parecen ser exclusivos de área (Tabla 4.20; Figura 4.21).

Tabla 4.20.- Distribución geográfica de los diferentes perfiles AFLP.

Área*	Cluster												Total
	1.1.1	1.1.2	1.1.3	1.1.4	1.2.5	1.3.6	2.1.1	2.1.2	2.1.3	2.1.4	3.1.2	4.1.4	
4		1		1			1						3
5	7	42	2	4	2		6	5		3			71
8		1											1
9	3	10				1		3	2			1	20
10	1										1		2
12	1	1											2
14			1										1
Total	12	55	3	5	2	1	7	8	2	3	1	1	100

04: Departamento de Salud 4, Hospital de Sagunto; 05: Departamento de Salud 5, Hospital Clínico; 08: Departamento de Salud 8, Hospital de Requena; 09: Departamento de Salud 9, Hospital General; 10: Departamento de Salud 10, Hospital Dr. Peset; 12: Departamento de Salud 12, Hospital S. Francisco de Borja de Gandía; 14: Departamento de Salud 14, Hospital Lluís Alcanyis de Xàtiva.

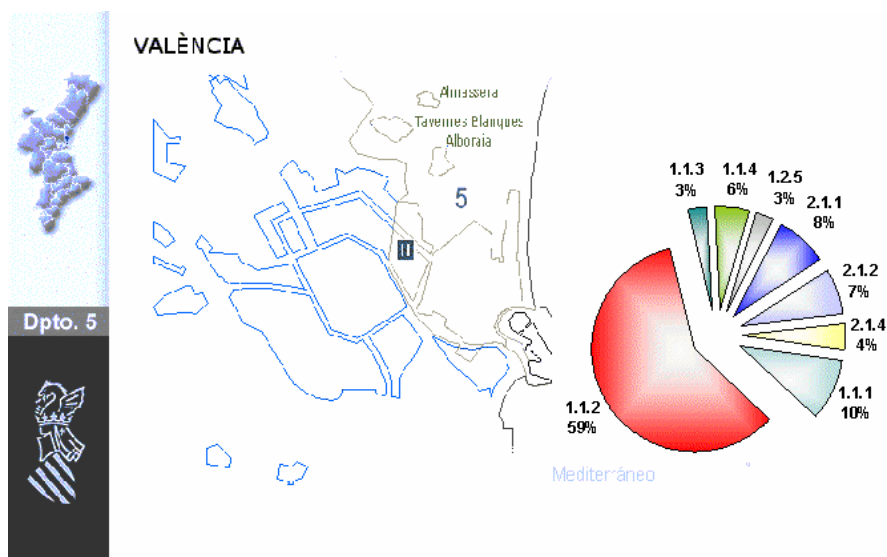


Figura 4.21.- Frecuencia relativa de los clusters detectados en el Departamento de Salud 5 (HCUV).

El análisis de los patrones en relación con el estado serológico de los pacientes frente a VIH determinó la ausencia de asociaciones significativas ($p > 0,05$) entre ambos parámetros, aunque algunos de ellos fueron detectados de modo exclusivo tanto en la población VIH positiva, como negativa (Tabla 4.21).

Tabla 4.21.- Distribución de perfiles AFLP según estado serológico de los pacientes.

Estado serológico	Cluster												Total
	1.1.1	1.1.2	1.1.3	1.1.4	1.2.5	1.3.6	2.1.1	2.1.2	2.1.3	2.1.4	3.1.2	4.1.4	
No consta	11	40	2	3	2	1	5	1		2	1	1	69
VIH	1	11	1	1			2	7	2	1			26
No VIH		4		1									5
Total	12	55	3	5	2	1	7	8	2	3	1	1	100

4.6.5 Poder discriminatorio del ensayo AFLP.

El índice de Simpson obtenido con los enzimas de restricción utilizados varió entre el 0,059 de Apa-C y el 0,549 de Apa-T, y el poder discriminatorio global fue del 0,673 (Tabla 4.22).

Tabla 4.22.- Poder discriminatorio del ensayo mediante AFLP.

Primer	Número de tipos	% de cepas del tipo mayoritario	Índice de Simpson
Apa-A	4	76,7	0,352
Apa-C	3	94,2	0,059
Apa-T	6	62,1	0,549
Apa-ACT	12	55,0	0,673

Se observó que al analizar en su conjunto los tres enzimas de restricción, se mejoraba el poder discriminatorio de la técnica, definiéndose un mayor número de *clusters*, aun a pesar de que éste se encuentra por debajo de lo que sería considerado recomendable por Hunter & Gaston (1988).

5 Discusión

5.1 Sobre la identificación convencional y la diversidad fenotípica.

Los aislados estudiados se caracterizaron por su gran homogeneidad fenotípica, ya que solo tres de ellos (2,9%) carecían de actividad hidrolítica del Tween, hecho descrito por otros autores (Calatayud *et al.*, 2004; Jiménez-Pajares *et al.*, 2005). Atendiendo a la variabilidad de las características fenotípicas de sus aislados, diversos autores han descrito en *M. kansasii* la existencia de diferentes biotipos (Tortoli *et al.*, 1994b; Calatayud *et al.*, 2004; Jiménez-Pajares *et al.*, 2005). Estos estudios demuestran que este organismo no es una especie homogénea, aunque discrepan entre si en el número de biotipos, es decir, en el grado de variabilidad fenotípica; ya que mientras Tortoli *et al.* (1994b) describen tan solo tres biotipos, Calatayud *et al.* (2004) y Jiménez-Pajares *et al.* (2005) refieren la existencia de ocho y 17 variedades, respectivamente.

A pesar de la escasa variabilidad detectada, los aislados fueron incluidos en los principales biotipos descritos por el grupo GEMKA (Calatayud *et al.*, 2004), los biotipos 1 y 2, de los cuales el más prevalente fue el biotipo 1 (97,1%), el más frecuente (83,9%) en el estudio de Calatayud *et al.* (2004). La homogeneidad fenotípica observada discrepa de los resultados publicados por Calatayud *et al.* (2004) y Jiménez-Pajares *et al.* (2005), pero coincide con la señalada por Tortoli *et al.* (1994b), quienes en un estudio sobre 69 aislados de diferentes ciudades italianas refieren tan solo la existencia de dos aislados atípicos, uno carente de actividad nitrataasa y otro niacina positiva; característica esta última inusual en esta especie, pero descrita por otros autores (Nachamkin *et al.*, 1992; Calatayud *et al.*, 2004; Jiménez-Pajares *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en el estudio de actividades enzimáticas mediante el sistema api[®]ZYM, de forma similar a lo descrito por Tortoli *et al.* (1994b), permitieron la diferenciación de dos grupos en función de la actividad α -fucosidasa, de modo que los aislados pertenecientes a pacientes VIH positivos fueron incluidos mayoritariamente en el biotipo 2, caracterizado por carecer de dicha actividad, tal como refieren Tortoli *et al.* (1994b).

5.2 Sobre la identificación molecular y la diversidad genética.

La evidencia de la heterogeneidad genética de *M. kansasii* se hizo patente en 1994, al comprobarse tras la comercialización de la sonda AccuProbe[®] que un determinado número de cepas identificadas como pertenecientes a esta especie atendiendo a sus características fenotípicas, eran no hibridantes (Tortoli *et al.*, 1994a). Tras ello, la sonda fue modificada y Tortoli *et al.* (1996) demuestran que la nueva versión es capaz de identificar las cepas no hibridantes de la versión antigua. No obstante, diferentes estudios han constatado que la nueva sonda AccuProbe[®] no permite la identificación de todos los aislados identificados por otros métodos moleculares (Richter *et al.*, 1999; Tortoli *et al.*, 2001).

En nuestro caso, todos los aislados clínicos, incluidos inicialmente en el estudio, y la cepa control *M. kansasii* CECT 3030 hibridaron con la sonda de DNA específica AccuProbe[®]. El único aislado no hibridante correspondía a una cepa introducida *a posteriori* en el estudio, procedente de Andalucía, e identificada por un centro de referencia mediante secuenciación del gen 16S rRNA como *M. kansasii* genotipo VI. Este resultado concuerda con los aportados en el trabajo de Richter *et al.* (1999), donde se señala que las cepas identificadas mediante PRA y secuenciación de la región espaciadora 16S-23S del rRNA como *M. kansasii* subespecie VI son las únicas que no son detectadas por la nueva versión de la sonda AccuProbe[®]; este hecho, junto con la evidencia según estos autores de que las cepas de *M. gastri*, a pesar de su cercanía genética dan un resultado negativo, avalan la utilidad de la sonda AccuProbe[®] como herramienta adecuada para la identificación de la mayor parte de aislados de esta especie que causan enfermedad en el hombre.

Se han desarrollado diversos procedimientos comerciales para la identificación molecular de *M. kansasii*, algunos de los cuales permiten a su vez la identificación genómica, como son las técnicas de hibridación inversa. Tortoli *et al.* (2001), en una evaluación de la técnica de hibridación inversa INNO-LiPA[®], en la que utilizan cepas hibridantes y no hibridantes con la sonda AccuProbe[®], demuestran que las cepas que hibridan con ambas versiones de

la sonda son identificadas por LiPA como pertenecientes al grupo I (*M. kansasii* genotipo I), mientras que las cepas que hibridan solo con la segunda versión de la sonda son identificadas como grupo II (*M. kansasii* genotipo II) y las cepas no hibridantes como grupo III, en el que están incluidos *M. kansasii* genotipo III a V y *M. gastri*.

La totalidad de cepas incluidas en nuestro estudio, fueron adecuadamente identificadas mediante el sistema comercial INNO-LiPA[®] Mycobacteria V2 como pertenecientes al genotipo I, excepto la cepa control *M. kansasii* genotipo VI que hibridó con la sonda correspondiente al grupo III de INNO-LiPA[®]; no se realizó la PCR-RFLP del gen *hsp65*, puesto que diversos autores han constatado una buena correlación entre los resultados obtenidos con esta técnica comercial y el PRA para la identificación de *M. kansasii* genotipo I (Miller *et al.*, 2000; Suffys *et al.*, 2001). Aunque, Suffys *et al.* (2001) refieren un caso en el que un aislado identificado mediante LiPA como genotipo I, fue por PCR-RFLP incluido en el genotipo III.

La prevalencia del genotipo I detectada en este estudio, es idéntica a la observada por Alcaide *et al.* (1997), quienes describen que las 51 cepas procedentes de Barcelona, pertenecen a dicho subtipo, y similar a lo comunicado por Gaafar *et al.* (2003) y Santín *et al.* (2004) quienes refieren que el 99,2% y el 97,8% de los aislados procedentes de Bilbao y de un área geográfica de Cataluña pertenecen a dicho genotipo. Además, en España, estudios posteriores como los de Jiménez-Pajares *et al.* (2005) y Alcaide *et al.* (2006) demuestran inequívocamente que el genotipo I es el más frecuentemente aislado a partir de muestras clínicas, con prevalencias que varían entre el 86,6% y el 92,5 %, respectivamente.

En Estados Unidos, en un estudio realizado por Zhang *et al.* (2004a) sobre 81 aislados procedentes de pacientes de diferentes estados, se observó de forma similar a lo que describimos en España, que el genotipo más prevalente era el genotipo I, al que pertenecían el 96,3% de las cepas, y que los genotipos II y III representaban tan solo el 1,2% y el 2,5%, respectivamente. Sin embargo, en estudios realizados en otros países

Europeos, a pesar de que el genotipo I sigue siendo el más prevalente, existe mayor diversidad en cuanto a los genotipos identificados. Así, Taillard *et al.* (2003) en un estudio realizado en Suiza, mediante el análisis de los fragmentos de restricción del gen *hsp65* detectan seis genotipos (I a IV, VI y VII), en 191 cepas obtenidas en seis laboratorios durante un periodo de siete años (1991-1997), y refieren que los genotipos más prevalentes son los tipos I, II y III que incluyen el 67%, 21% y 8% de las cepas, respectivamente. Además, señalan que la mayoría de los aislados identificados como genotipo II habían sido obtenidos de pacientes inmunodeprimidos, bien por tratamiento crónico con corticosteroides, bien por coinfección por VIH. Tal asociación, no es posible hacerla en nuestro caso, puesto que independientemente del estado de inmunosupresión de los pacientes, todas las cepas pertenecen al genotipo I.

5.3 Sobre la sensibilidad a los antibióticos.

La elevada actividad de los fármacos considerados como antituberculosos de primera línea (isoniazida, rifampicina y etambutol) en el tratamiento de las infecciones causadas por *M. kansasii* encontrado en este estudio, es discordante con los patrones de sensibilidad descritos previamente por otros autores. Estas diferencias podrían estar relacionadas con: i) el método empleado en el estudio de sensibilidad; ii) la prevalencia de determinados patrones de sensibilidad en áreas geográficas concretas; iii) los puntos de corte considerados en la valoración de la sensibilidad de los aislados objeto de estudio.

El porcentaje de aislados resistentes a la isoniazida descrito por Wallace *et al.* (1986) en EEUU (77.8%), y Garrós *et al.* (2001) en Bilbao (10%), mediante microdilución y el método de las proporciones respectivamente, tomando como punto de corte una concentración de 1 mg/L, discrepa de los resultados obtenidos en el presente estudio (0%) siguiendo para la interpretación los criterios recomendados por CLSI (5 mg/L) (NCCLS, 2003). Sin embargo, si consideramos el mismo criterio que los autores previamente citados, obtendríamos un porcentaje de aislados resistentes a la isoniazida del

65%, más parecido al descrito por Wallace *et al.* (1986), pero discordante con el informado por Garrós *et al.* (2001). Por otro lado, nuestros resultados contrastan también con los datos publicados por Da Silva Telles *et al.* (2005), quienes mediante microdilución y utilizando el mismo punto de corte que en este estudio, describen en Brasil resistencias del 8,3%, y con los de Alcaide *et al.* (2004) que refieren resistencias de alto nivel (>10 mg/L) en el 4,1% de sus aislados.

Los porcentajes de aislados resistentes a la rifampicina (0,9%) y al etambutol (2,9%) obtenidos en nuestro estudio, son más bajos que los informados en EEUU por Wallace *et al.* (1986) y en Brasil por Da Silva Telles *et al.* (2005), quienes citan resistencias del 37% y 25,9%, y del 12,5% y 93,8%, respectivamente, usando los mismos criterios. Sin embargo, nuestros índices de resistencia a estos dos antituberculosos son más parecidos a los publicados en España por Garrós *et al.* (2001) y Alcaide *et al.* (2004) quienes informan resistencias a rifampicina y etambutol del 3,3% y 6,6%, y del 3,4% y 0%, respectivamente. Además, nuestros datos coinciden prácticamente con los comunicados por Shitrit *et al.* (2006) en Israel quienes citan resistencias del 0% y 2%, respectivamente. De modo que, el bajo grado de resistencia al etambutol y a la rifampicina que hemos encontrado entre los aislados del área de influencia del HCUV, apoya el uso de estos fármacos en el tratamiento inicial de las infecciones por *M. kansasii*.

La actividad *in vitro* de la rifabutina con un 100% de aislados sensibles, es idéntica a la comunicada por Zwolska-Kwiek *et al.* (1993) y superior a la informada por Da Silva Telles *et al.* (2005), quienes refieren resistencias del 7,7% en aislados entre los que la proporción de resistentes a rifampicina era del 12,5%. El aislado rifampicin-resistente detectado en nuestra serie fue inhibido por la rifabutina a una concentración de 1 mg/L, cercana al punto de corte recomendado para este antibiótico.

El tratamiento habitual de la infección pulmonar por *M. kansasii* en pacientes que no toman inhibidores de las proteasas, según las recomendaciones de la American Thoracic Society incluye tres fármacos:

isoniazida, rifampicina y etambutol, ya que los aislados obtenidos de pacientes que no han recibido tratamiento específico son inhibidos por éstos y otros fármacos a concentraciones séricas fácilmente alcanzables con las dosis terapéuticas habituales (Wallace *et al.*, 1997). A pesar de ello, debido a la resistencia *in vitro* de *M. kansasii* a la isoniazida descrita por algunos autores (Wallace *et al.*, 1986), la inclusión de este fármaco en el régimen terapéutico es controvertida, por lo que se ha propuesto su exclusión (Rooney *et al.*, 1996). Sin embargo, la buena actividad de la isoniazida frente a *M. kansasii* detectada en este estudio, la baja frecuencia de recaídas después del tratamiento con isoniazida, rifampicina y etambutol si se compara con el régimen que incluye sólo rifampicina y etambutol (Evans *et al.*, 1996b; British Thoracic Society, Research Comité., 1994), el efecto sinérgico de la isoniazida y la experiencia clínica (Evans *et al.*, 1996b), apoyan el uso empírico de la triple asociación hasta que los resultados del estudio de sensibilidad estén disponibles.

Los macrólidos, claritromicina y azitromicina, han mostrado una buena actividad *in vitro*. Los valores de CMI obtenidos con claritromicina (CMI₅₀ ≤ 0,06 mg/L; CMI₉₀ 0,125 mg/L) son similares a los descritos por otros autores quienes informan en sus ensayos CMI₅₀ y CMI₉₀ de ≤ 0,125 y 0,25 mg/L, y de 0,25 y 0,5 mg/L, respectivamente (Biehle & Cavalieri, 1992; Brown *et al.*, 1992; Witzig & Franzblau, 1993; Alcaide *et al.*, 2004). Sin embargo, difieren de los valores publicados por Yew *et al.* (1994) quienes refieren una CMI₉₀ de 1 mg/L, a pesar de que dicho valor también debe ser considerado dentro del rango de sensibilidad al fármaco. Por otro lado, la actividad de azitromicina (CMI₅₀= 0,5 mg/L; CMI₉₀= 1,0 mg/L), contrasta con los datos aportados por Witzig & Franzblau (1993) quienes comunican una CMI₅₀ y una CMI₉₀ de 8 mg/L, mucho más elevadas que las que nosotros detectamos, y fronterizas con el punto de corte (≥ 16 mg/L) empleado (NCCLS, 2003).

De nuestro estudio se desprende que la actividad *in vitro* de las quinolonas frente a *M. kansasii* guarda relación con el grupo al que pertenecen, siendo más activas las de 4^a generación (moxifloxacino) que las de 3^a generación (ciprofloxacino, enrofloxacino), y estas más activas que las de 2^a

generación (enoxacino, lomefloxacino). Esta observación es similar a lo demostrado por Sulochana *et al.* (2005) en *M. tuberculosis* quienes clasifican a las quinolonas ensayadas en el siguiente orden creciente de actividad: lomefloxacino < ciprofloxacino ≤ ofloxacino < esparfloxacino < gatifloxacino = moxifloxacino. Evidentemente, la elevada proporción de aislados resistentes a las quinolonas de segunda generación ensayadas, desaconseja su utilización en el tratamiento empírico de las infecciones producidas por *M. kansasii*. La frecuencia de aislados resistentes a ciprofloxacino (16,5%) detectada en este estudio contrasta con la ausencia de resistencias descrita por Salfinger *et al.* (1988) en Suiza y Gillespie & Billington (1989) en Inglaterra, que podría guardar relación con el escaso número de cepas incluidas en ambos estudios, y discrepa con el elevado porcentaje de resistencias (66,3%), descrito por Da Silva Telles *et al.* (2005) en Brasil.

Los resultados obtenidos con moxifloxacino (CMI₅₀ = ≤ 0,06 mg/L; CMI₉₀ = 0,125 mg/L), coinciden en líneas generales con los informados por Gillespie & Billington (1999) y Alcaide *et al.* (2004) quienes señalan una CMI₅₀ y CMI₉₀ de ≤ 0,06 y 0,06 mg/L, y de 0,06 mg/L para ambos parámetros, respectivamente. Pero son más bajos que los comunicados por Rodríguez *et al.* (2003) quienes mediante un método de dilución en agar obtienen una CMI₅₀ de 0,125 y una CMI₉₀ de 2 mg/L.

Los valores de CMI obtenidos con claritromicina y moxifloxacino, junto con la buena distribución tisular de ambos antibióticos (Fassbender *et al.*, 1996; Moise *et al.*, 2000) apoyan su uso como fármacos alternativos en el tratamiento de las infecciones por *M. kansasii* en aquellos pacientes en que se produzca un fallo terapéutico debido a la resistencia a la rifampicina y/o en pacientes con SIDA que estén recibiendo tratamiento con inhibidores de las proteasas, como ha sido previamente informado (Biehle & Cavalieri, 1992; Wallace *et al.*, 1994; Graybill & Bocanegra 2001).

Se han publicado pocos estudios sobre la actividad *in vitro* del linezolid frente a *M. kansasii* (Brown-Elliott *et al.*, 2003; Rodríguez Díaz *et al.*, 2003; Alcaide *et al.*, 2004). Uno de ellos informa una CMI₅₀ de 4 y una CMI₉₀

>32 mg/L (Rodríguez *et al.*, 2003); sin embargo, con resultados similares a los informados por Alcaide *et al.* (2004), los datos obtenidos en nuestro estudio muestran que es un antibiótico con una excelente actividad frente a este organismo (CMI₅₀: 0,5 mg/L; CMI₉₀: 1 mg/L), con un 100% de aislados sensibles, ya que en todos los casos su crecimiento fue inhibido por concentraciones de antibiótico que se encontraban por debajo del punto de corte (\leq 8 mg/L) establecido para las micobacterias (Wallace *et al.*, 2001; Brown-Elliott *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito la actividad de este antibiótico en un modelo experimental murino de infección por *M. kansasii*, a pesar de que el tratamiento con linezolid solo o asociado a claritromicina era menos eficaz que este último antibiótico asociado o no a rifampicina (Cynamon *et al.*, 2003); todo ello, unido a sus características farmacocinéticas (Conte *et al.*, 2002) y a la posibilidad de tratar las infecciones por micobacterias no tuberculosas usando 600 mg en una sola dosis diaria (Brown-Elliott *et al.*, 2001), sugiere que este antibiótico podría ser empleado en el tratamiento poliquimioterápico de la enfermedad por *M. kansasii* cuando se sospeche resistencia a rifampicina.

De modo que, los bajos valores de CMI's obtenidos en este estudio con la claritromicina, linezolid y moxifloxacino, y los antecedentes de éxito en el tratamiento de la enfermedad pulmonar por *M. kansasii* con un régimen terapéutico de claritromicina tres veces por semana informado por Griffith *et al.* (2003) apoyan la posibilidad de incorporar cualquiera de estos fármacos en regímenes terapéuticos cortos o intermitentes. A pesar de ello, son necesarios nuevos estudios que demuestren la correlación entre los datos microbiológicos y la efectividad clínica del linezolid en el tratamiento de las infecciones por *M. kansasii*.

La ausencia de aislados estreptomycin-resistentes detectada en este estudio ha sido descrita por otros autores (Wallace *et al.*, 1986; Alcaide *et al.*, 2004), pero contrasta con los datos facilitados por Garrós *et al.* (2001) en España y Da Silva Telles *et al.* (2005) en Brasil, quienes señalan resistencias del 90% y del 14,2%, respectivamente. Los resultados obtenidos con amikacina

son similares a los informados por Ernst *et al.* (1988), quienes describen una CMI₅₀ de 2 mg/L y una CMI₉₀ de 4 mg/L; también son bastante coincidentes con los datos descritos por Wallace *et al.* (1994) quienes describen que el 94,3% de las cepas rifampicín-resistentes incluidas en su estudio fueron inhibidas a una concentración \leq 8 mg/L de amikacina; sin embargo, discrepan con el 3% de aislados resistentes comunicados por Da Silva Telles *et al.* (2005).

Respecto a la clofazimina nuestros resultados, con un 4,9% de aislados resistentes, discrepan claramente de los obtenidos por Da Silva Telles *et al.* (2005) que citan una frecuencia de resistencias del 42,9%. Sin embargo, son mucho más cercanos a los informados por Wallace *et al.* (1994) quienes detallan que las 36 cepas rifampicín-resistentes estudiadas, fueron sensibles a este antibiótico.

Por otro lado, la CMI₉₀ obtenida para el PAS (8 mg/L), coincide con la citada por Inderlied & Nash (2005), quienes en su revisión sobre antimicobacterianos refieren para este compuesto una CMI₉₀ entre 5 y 10 mg/L.

Particularmente activo fue el cloruro de benzalconio, para el que obtuvimos una CMI₅₀ y CMI₉₀ de 4 mg/L, en ambos casos. Este es un compuesto amónico cuaternario, con actividad frente a bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus*; se ha demostrado en estudios experimentales, que tiene poder micobacteriostático incluso a bajas concentraciones, tanto frente a cepas sensibles como multiresistentes de *M. tuberculosis* (Rikimaru *et al.*, 2000). Por otro lado, Shimizu *et al.* (2002) en un estudio en el que evalúan la sensibilidad de un gran número de cepas a diversos antisépticos constatan que este compuesto y la povidona iodada son los más activos. Por lo tanto, existen referencias en la literatura que avalan la posible utilidad del cloruro de benzalconio como antiséptico micobacteriano de uso clínico, a expensas de que se realicen más estudios sobre la actividad *in vitro* de dicha sustancia.

El rango de CMI y las CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos con la trifluoroperazina no pueden compararse con los de otros estudios realizados con esta especie,

ya que no hemos hallado información bibliográfica al respecto. No obstante, los resultados descritos coinciden parcialmente con los comunicados para otras micobacterias (Reddy *et al.*, 1996; Gadre & Talwar, 1999) y avalan los resultados previos de nuestro grupo con *M. avium* complex y *M. tuberculosis* (García García *et al.*, 2004; García García *et al.*, 2005). La trifluoroperazina es una fenotiazina empleada en el tratamiento de trastornos psicóticos. Se trata de un fármaco antagonista de la calmodulina, sobre el que existen diversos estudios que demuestran que es capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de *M. tuberculosis* sensible y multiresistente (Ratnakar & Murthy, 1992; Gadre & Talwar, 1999; García García *et al.*, 2005) y de *M. avium* complex (Reddy *et al.*, 1996; García García *et al.*, 2004).

Reddy *et al.* (1996) en un estudio sobre la actividad *in vitro* de la trifluoroperazina frente a *M. tuberculosis* y *M. avium* complex obtuvieron rangos de CMI entre 3,12 mg/L y 25 mg/L y 12,5 mg/L y 50 mg/L, respectivamente, y Gadre & Talwar (1999) refieren que el rango de la CMI para aislados de *M. tuberculosis* sensibles y resistentes a estreptomycin e isoniazida varia entre 8 mg/L y 32 mg/L. Por otro lado, Reddy *et al.* (1996) señalan que este fármaco *in vitro* carece de actividad sinérgica con isoniazida y rifampicina. Sin embargo, refieren que a concentraciones de 2 a 4 mg/L, este fármaco es activo frente a *M. tuberculosis* cocultivado con la línea celular macrofágica U937, produciendo una reducción mayor que la obtenida con isoniazida 0,05 mg/L, y que incrementa la acción microbicida de la isoniazida y de la rifampicina (Reddy *et al.*, 1996). Pero las concentraciones a las cuales la trifluoroperazina muestra actividad antimicobacteriana *in vitro* e *in vivo-in vitro* son demasiado elevadas para ser obtenidas en circunstancias terapéuticas normales, ya que los picos séricos máximos con dosis de 5 mg/kg *po* y 20 mg/kg *po* son de 1,4 µg/L y 4 µg/L, respectivamente. Sin embargo, a concentraciones subinhibitorias potencia la actividad intracelular de isoniazida y rifampicina frente a *M. tuberculosis*, probablemente debido a que aumenta la acumulación y retención intracelular de estos fármacos antimicobacterianos. Todo ello, sugiere que el desarrollo de fármacos análogos de trifluoroperazina o preparaciones

liposomales podría ser una alternativa para aumentar las dos funciones del fármaco (Reddy *et al.*, 1996).

Amaral *et al.* (2001) comentan que las fenotiazinas, en concreto la clorpromacina, presenta actividad *in vitro* a unas concentraciones que no son clínicamente alcanzables a las dosis terapéuticas habituales; esto, junto a su toxicidad desaconseja su uso como fármaco antimicobacteriano. Sin embargo, estas dos limitaciones pueden ser obviadas si se tiene en cuenta que la clorpromacina cuando se da a las dosis terapéuticas habituales, se concentra en el interior de los macrófagos alcanzando una concentración comparable a las niveles efectivos frente a cepas de *M. tuberculosis* multiresistente. (Bettencourt *et al.*, 2000).

5.4 Sobre la evaluación del sistema Bactec[®] MGIT 960 para los estudios de sensibilidad.

El objetivo de esta parte del trabajo, fue evaluar la capacidad del sistema fluorométrico automatizado Bactec[®] MGIT 960 para llevar a cabo el estudio de sensibilidad de *M. kansasii* frente a cuatro antituberculosos clásicos, modificando las concentraciones de la estreptomina e isoniazida, de modo que los puntos de corte fueran los establecidos por CLSI (NCCLS, 2003) para dicho microorganismo, y compararlo con los resultados obtenidos con la técnica de microdilución, que nosotros consideramos como el método de referencia.

Existen diversos trabajos comparativos sobre la utilidad del sistema Bactec[®] MGIT 960 para el estudio de sensibilidad de fármacos de primera y segunda línea, aunque siempre referidos a *M. tuberculosis*. Bastian *et al.* (2001) en un estudio comparativo del sistema automatizado Bactec[®] MGIT 960 frente al método de las proporciones, para el estudio de sensibilidad de *M. tuberculosis* a kanamicina, refieren una concordancia del 98,6% y que el tiempo medio de obtención de los resultados por el sistema automatizado fue de 7 días. Scarparo *et al.* (2004) comparan el Bactec[®] MGIT 960 y el Bactec[®] 460 TB para el estudio de sensibilidad de *M. tuberculosis* frente a antituberculosos

clásicos, obteniendo un 96,3% de concordancia. Huang *et al.* (2004) realizan un estudio comparativo entre el Bactec[®] MGIT 960 y un método de dilución en agar, en el que ensayan la actividad de ciprofloxacino y etionamida frente a *M. tuberculosis* complex, y demuestran una buena concordancia, alrededor del 90,0% para ambos fármacos entre los dos métodos, concluyendo que el sistema automatizado es comparable al método de referencia establecido por NCCLS y que además tiene la ventaja de ser más rápido (tiempo medio de 8,9 días), menos laborioso y fácil de normalizar. Resultados y conclusiones similares a los comunicados por Rüsç-Gerdes *et al.* (2006) y Krüüner *et al.* (2006) en sendos estudios sobre la utilidad de Bactec[®] MGIT 960 para los ensayos de sensibilidad de *M. tuberculosis* complex a fármacos de segunda línea.

Resultados similares son los que se derivan de los datos obtenidos en nuestro ensayo, donde encontramos que: i) el estudio de sensibilidad mediante el sistema Bactec[®] MGIT 960 resultó más fácil de realizar, por ser menos laborioso que el método de microdilución; ii) no hubo complicaciones para la preparación del inóculo y los tiempos que empleó el sistema para detectar sensibilidad fueron satisfactorios y por debajo del tiempo empleado por otras técnicas; además, el sobrecrecimiento o la contaminación bacteriana se detectaban automáticamente, e incluso ésta última era fácil de detectar a simple vista; iii) los resultados obtenidos con el Bactec[®] MGIT 960 fueron fácilmente interpretables, y los valores más objetivos y precisos que los obtenidos con el método de microdilución.

Además, la confirmación de los resultados obtenidos para la cepa de referencia *M. kansasii* CECT 3030 con el sistema automatizado Bactec[®] MGIT 960, dada su absoluta concordancia con el método de microdilución y el patrón de sensibilidad informado por la CECT para dicha cepa, ayudan a validar esta técnica. Todo ello, junto con el alto índice de concordancia entre los resultados obtenidos por el método de microdilución y el sistema automatizado Bactec[®] MGIT 960 (98,3%), similar al descrito por otros autores para *M. tuberculosis* (Bastian *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004; Scarparo *et al.*, 2004), avalan que

dicho sistema, con las modificaciones incluidas en nuestro estudio, podría ser empleado de forma rutinaria para el estudio de sensibilidad de *M. kansasii* en los laboratorios clínicos en países desarrollados, ya que se obtienen resultados objetivos y su interpretación está referida al punto de corte establecido para *M. kansasii* por CLSI (NCLS, 2003), aunque sería necesarios estudios multicéntricos que confirmaran estos resultados.

5.5 Sobre el análisis del polimorfismo genético.

Diversos autores, como Wallace *et al.* (1993) han demostrado que la caracterización de cepas micobacterianas por PFGE es útil para llevar a cabo estudios epidemiológicos que tracen fuentes de contaminación y marquen brotes epidémicos. En el caso de *M. kansasii*, Picardeau *et al.* (1997) señalan que este procedimiento es una herramienta útil para revelar polimorfismos, con buena tipabilidad y reproductibilidad, ya que el análisis de 24 cepas del genotipo I con el enzima *DraI* les permitió la obtención de cuatro grupos de homología; aunque también señalan, que tres de las cepas incluidas en su estudio no pudieron ser tipificadas debido a la degradación del DNA, hecho descrito para otras micobacterias por Wallace *et al.* (1993). Siguiendo esta misma línea, en la publicación de Alcaide *et al.* (1997) sobre el polimorfismo de aislados de *M. kansasii* genotipo I, tras digestión del DNA con la restrictasa *DraI*, se describen cinco patrones con diferencias mínimas en el polimorfismo de los fragmentos de restricción, lo que les sugiere la estructura clonal del genotipo más prevalente en humanos, *M. kansasii* genotipo I.

El escaso polimorfismo genético descrito en estos trabajos (Alcaide *et al.*, 1997; Picardeau *et al.*, 1997) coincide en líneas generales con los resultados obtenidos en el presente estudio. El análisis mediante PFGE resultó ser reproducible, y sólo permitió la descripción de tres grupos de homología, uno con el enzima *VspI* y dos con *XbaI*; pero la aplicación de los criterios de Tenover *et al.*, (1995), a los resultados obtenidos con este último enzima demostró que todos los aislados pertenecían al mismo clon; aunque la clonalidad detectada entre los aislados estudiados podría guardar relación con

la proporción de fracasos obtenidos, 27% con *Vspl* y 44,9% con *Xbal*, relacionados con la degradación de DNA, tal como refieren Wallace *et al.* (1993) y Picardeau *et al.* (1997).

Sin embargo, hay otros autores que describen resultados discordantes, como Inuma *et al.* (1997), quienes tras el análisis de los perfiles de restricción obtenidos con 84 aislados clínicos de cinco distritos japoneses, describen con el enzima *Vspl* la existencia de 21 grupos de homología. En este sentido, Zhang *et al.* (2004a) realizan en Estados Unidos un estudio de PFGE con 81 aislados clínicos de *M. kansasii* caracterizados mediante PRA como pertenecientes al genotipo I (96,3%), genotipo II (1,2%) y genotipo III (2,5%), demostrando mediante el empleo de tres enzimas de restricción (*DraI*, *AseI* y *XbaI*) que un 32,4% a un 43,7% de los aislados pertenecían a un solo *cluster*.

Tal como señalan Alcaide *et al.* (1997), llama la atención la distribución clonal de las cepas de *M. kansasii* productoras de infección en el hombre, es decir el hecho de que un solo clon de *M. kansasii* sea responsable de la mayoría de casos de enfermedad humana, tratándose de una especie que tiene un reservorio medioambiental, ya que los estudios de PFGE sobre otras especies de origen ambiental, como *M. avium* complex, muestran casi tantos patrones PFGE como aislados existen; lo que sugiere que hay determinados factores, como factores de colonización dentro de los sistemas de distribución de agua y factores de virulencia presentes en un clon de microorganismos, que ayudan a seleccionar uno o más genotipos específicos. De hecho, en el caso de *M. kansasii*, tal y como exponen en sus trabajos Alcaide *et al.* (1997) y Picardeau *et al.* (1997), existen al menos cinco subespecies y múltiples clones de microorganismos en los sistemas de distribución de agua, pero es una subespecie, el genotipo I, la responsable de más del 90% de los casos clínicos. Parece que la explicación más plausible sea la existencia de factores de virulencia en este grupo de microorganismos que determinan este hecho.

La clonalidad detectada en este estudio entre los aislados del genotipo I, la elevada proporción de fracasos relacionada con la degradación

de DNA, y la laboriosidad y duración de los protocolos PFGE, hizo siguiendo las recomendaciones de Picardeau *et al.* (1997) que nos decantásemos hacia otro método de tipificación.

El análisis del polimorfismo mediante AFLP, resultó en nuestro caso una técnica mucho más sencilla de aplicar, mucho menos tediosa en su preparación y con mayor tipabilidad y poder discriminatorio que PFGE. En nuestro estudio, el enzima *Apal* fue elegido para llevar a cabo la técnica AFLP, siguiendo el protocolo descrito por Gaafar *et al.* (2003), atendiendo a la presunción teórica de que dicho enzima se une al genoma de microorganismos con alto contenido en guanina y citosina tales como el de *M. kansasii* (G-C del 64%), con una frecuencia relativamente alta (Janssen *et al.*, 1996).

Mientras que el número de patrones generados con un solo iniciador fue relativamente bajo, el poder discriminatorio de la técnica se incrementó ostensiblemente al analizar en su conjunto los patrones generados con los tres *primers*, consiguiendo así clasificar los aislados en 12 grupos de homología. La reproducibilidad del método fue muy buena y los patrones fueron estables durante el periodo de cinco meses que duró el estudio. Estos resultados son comparables y muy similares a los descritos por Gaafar *et al.* (2003); pero discrepan de los comunicados por Picardeau *et al.* (1997) con el enzima de restricción *PstI*, ya que estos autores refieren que los patrones obtenidos con el genotipo I eran muy similares o incluso idénticos y sólo unas pocas cepas presentaron patrones diferentes del compartido por la mayoría.

Uno de los objetivos que nos propusimos en nuestro estudio, fue determinar el poder discriminatorio de las técnicas empleadas en la tipificación de los aislados y en función de las características de las mismas y los resultados obtenidos establecer su utilidad como marcadores. Existen diversos factores numéricos que son capaces de demostrar cuál es el método de tipificación más eficiente: tipabilidad, o porcentaje de cepas diferentes que pueden ser identificadas por un marcador, reproductibilidad, o porcentaje de cepas que dan el mismo resultado en repetidos ensayos, y poder de discriminación. El poder discriminatorio de un método, o su capacidad para

distinguir entre cepas no relacionadas, está determinado por el número de tipos definidos por el ensayo y su frecuencia (Hunter & Gaston; 1988). Estos autores propusieron un índice numérico de discriminación basado en la probabilidad de que dos cepas no relacionadas sean caracterizadas como pertenecientes a un mismo tipo, el índice de diversidad de Simpson, que permite la comparación de métodos de tipificación y seleccionar aquel que muestre un mayor poder de discriminación. El índice viene dado por una ecuación que puede ser aplicada tanto para la comparación directa de diferentes métodos, como para el análisis del poder de discriminación de esquemas de tipificación combinados. Según consideran Hunter & Gaston (1988), el nivel aceptable de discriminación dependerá en cada caso de un gran número de factores, pero un índice mayor del 0,90 sería lo deseable para que los resultados pudieran ser interpretados con confianza.

En nuestro estudio, se obtuvo un alto grado de uniformidad en la tipificación molecular de los aislados, tanto por PFGE como por AFLP, siendo la reproductibilidad excelente para ambos métodos y superior la tipabilidad y el poder discriminatorio del segundo de ellos. No obstante, dada la homogeneidad de nuestros aislados el poder discriminatorio de la técnica AFLP se encuentra por debajo de lo deseable (Hunter & Gaston; 1988). Así pues, a pesar de la relativa clonalidad observada en *M. kansasii* genotipo I, que podría atribuirse al escaso poder discriminatorio de los métodos empleados, consideramos que el análisis del polimorfismo mediante AFLP es un método más apropiado para llevar a cabo la tipificación de cepas de *M. kansasii* con fines epidemiológicos.

6 Conclusiones

Los resultados descritos en nuestro estudio nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- 1^a. Los aislados estudiados muestran una marcada homogeneidad fenotípica. De las características analizadas, sólo la hidrólisis del Tween 80 mostró resultados variables, y permitió junto con otras actividades la clasificación de los aislados en dos de las variedades fenotípicas descritas por Calatayud *et al.* (2004), de las cuales la más prevalente fue el biotipo 1 en el que quedaron incluidos la mayoría de los aislados.
- 2^a. La variable α -fucosidasa permitió la identificación de dos fenotipos, según el esquema de biotipia de Tortoli *et al.* (1994), y establecer una asociación significativa entre el biotipo 2, caracterizado por la ausencia de dicha actividad, e infección por VIH.
- 3^a. El hecho de que todos los aislados estudiados pertenezcan al genotipo I y la escasa variabilidad detectada tras el estudio de su polimorfismo genético, demuestran la estructura clonal de este microorganismo en el área de influencia del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- 4^a. El análisis de la diversidad genética demuestra que AFLP, a pesar de su moderado poder de discriminación, es la única herramienta molecular empleada, eficaz para el estudio del polimorfismo genético de *M. kansasii* genotipo I, ya que sus índices de tipabilidad y discriminación son superiores a los obtenidos con PFGE, y permite la descripción de grupos de homología frente a la aparente clonalidad obtenida con PFGE.
- 5^a. La buena actividad *in vitro* demostrada para isoniazida, rifampicina y etambutol aconsejan su recomendación para el tratamiento poliquimioterápico empírico ante la existencia de sospecha morfológica de infección por este microorganismo. En el caso de

pacientes VIH positivos sometidos a tratamiento anti-retroviral con inhibidores de proteasas, la rifampicina debe ser sustituida por rifabutina o claritromicina, antibióticos frente a los que no hemos detectado resistencia alguna.

- 6^a. La ausencia de aislados resistentes a claritromicina, linezolid y moxifloxacino apoyan la posibilidad de utilizar pautas de tratamiento cortas o intermitentes que contengan uno de estos tres fármacos frente a la inclusión de estreptomina o amikacina, que aunque son igualmente activos, tienen mayores efectos colaterales, así como, su utilización en el caso de infecciones debidas a aislados resistentes a rifampicina.
- 7^a. Consideramos que el sistema automatizado Bactec[®] MGIT 960, utilizando las concentraciones de fármacos propuestas por CLSI, es una herramienta útil, menos laboriosa y más rápida y objetiva que la técnica de microdilución en placa, y por lo tanto adecuada para la realización de estudios de sensibilidad de *M. kansasii* a los antibióticos de primera línea.

7 Bibliografía

1. Abed Y, Bollet C and De Micco P. 1995. Demonstration of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity by the amplification of the 16S-23S spacer region. J Med Microbiol, 42: 112-114.
2. Ahn CH, Nash DR and Hurst GA. 1976. Ventilatory defects in atypical mycobacteriosis. Am Rev Respir Dis, 113: 273-279.
3. Ahn CH, Lowell JR, Ahn SA, Ahn S and Hurst GA. 1981. Chemotherapy for pulmonary disease due to *Mycobacterium kansasii*: efficacies of some individual drugs. Rev Infect Dis, 3: 1028-1034.
4. Ahn CH, McLarty JW, Ahn SS, Ahn SI and Hurst GA. 1982. Diagnostic criteria for pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium intracellulare*. Am Rev Respir Dis, 125: 388-391.
5. Ahn CH, Lowell JR, Ahn SS, Ahn SI and Hurst GA. 1983. Short course chemotherapy for pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii*. Am Rev Respir Dis, 128: 1048-1050.
6. Ahn CH, Wallace RJ, Steele LC Jr and Murphy DT. 1987. Sulfonamide-containing regimens for disease caused by rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. Am Rev Respir Dis, 135:10-16.
7. Albright JT and Pransky FM. 2003. Nontuberculous mycobacterial infections of the head and neck. Pediat Clin North Am, 50: 503-514.
8. Alcaide F, Richter I, Bernasconi C, Springer B, Hagenau C, Schulze-Röbbecke R, Tortoli E, Martín R, Böttger EC and Telenti A. 1997. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. J Clin Microbiol, 35: 1959–1964.
9. Alcaide F y Benítez MA. 1999. Aspectos microbiológicos de la infección por *Mycobacterium kansasii*. Boletín de Control de Calidad SEIMC, 11(1): 71-79.
10. Alcaide F, Calatayud L, Santín M y Martín R. 2004. Comparative *in vitro* activities of linezolid, telithromycin, clarithromycin, levofloxacin, moxifloxacin and four conventional antimycobacterial drugs against *Mycobacterium kansasii*. Antimicrob Agents Chemother, 48: 4562-4565.
11. Alcaide F, Cardeñosa E, Calatayud M, Santín M, Dorca J y Martín R. 2006. Infección por *M. kansasii* en España (2000-2005): Datos del grupo español de estudio de *M. kansasii* (GEMKA). Enferm Infecc Microbiol Clin, 24 (Espec Congr): 16.

12. Amaral L, Kristiansen JE, Viveiros M and Atouguia J. 2001. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as anti-tuberculosis therapy. *J Antimicrob Chemother*, 47: 505-511.
13. Andersen P. 1994. The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*, 191: 537-547.
14. Anonymous. 1974. American Thoracic Society. Diagnostics standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial diseases. New York: American Lung Association. (citado por: Kubica P and Good R. 1981. The Genus *Mycobacterium*. In Starr M, Stolp H, Truper HG, Balows A and Schlegel HG (Eds) *The Prokaryotes. A Handbook of Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Volume II, pp. 1962-1984. New York, Springer-Verlag).
15. Anonymous. 1975. British Thoracic and Tuberculosis Association. Opportunist mycobacterial pulmonary infection and occupational dust exposure: an investigation in England and Wales. *Tubercle*, 56: 295-310.
16. Anonymous. 1983. *The Merck Index*. Windholz M, Budavari S, Blumetti RF and Otterbein ES (Eds). Merck and Co, Inc. 10th ed. Rahway NJ, USA.
17. Anonymous. 1990. American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*, 142: 940-953.
18. Arend SM, de Haas P, Leyten E, Rosenkrands I, Rigouts L, Andersen P, Mijs W, van Dissel JT and van Soolingen D. 2005. ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of *Mycobacterium kansasii*. *J Infect Dis*, 191: 1301-1310.
19. Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J and Maridonneau-Parini I. 1999. The mannose receptor mediate uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal response of human macrophages. *Infect Immun*, 67: 467-477.
20. Bailey RK, Wyles S, Dingley M, Hesse F and Kent GW. 1970. The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water. *Am Rev Respir Dis*, 101: 430-431.
21. Banks J, Hunter AM, Campbell IA and Smith AP. 1983. Pulmonary infection with *Mycobacterium kansasii* in Wales, 1970-9: review of treatment and response. *Thorax*, 38: 271-274.

22. Baquero-Artigao F. 2005. Infección pediátrica por micobacterias no tuberculosas. *Ann Pediatr* 62: 458-466.
23. Barham GS and Hargreaves DG. 2006. *Mycobacterium kansasii* olecranon bursitis. *J Med Microbiol*, 55: 1745-1746.
24. Bartralot R, Pujol RM, García-Patos V, Sitjas D, Martín-Casabona N, Coll P, Alomar A and Castells A. 2000. Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. *J Cutan Pathol*, 27: 124–129.
25. Bastian I, Rigouts L, Palomino JC and Portaels F. 2001. Kanamycin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using *Mycobacterium* Growth Indicator Tube and a colorimetric method. *Antimicrob Agent Chemother*, 45: 1934-1936.
26. Beran V, Matiova L, Dvorska L, Svastova P and Pavlik I. 2006. Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *J Fish Dis*, 29: 383-393.
27. Belisle JT and Brennan PJ. 1989. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol*, 171: 3465-3470.
28. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennen PJ and Besra GS. 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science*, 30: 1420-1422.
29. Bergen GA, Yangco BG and adelman HA. 1993. Central nervous system infection with *Mycobacterium kansasii*. *Ann Intern Med*, 118: 396.
30. Bernard L, Vincent V, Lortholary O, Raskine L, Vettier C, Colaitis D, Mechali D, Bricaire F, Bouvet E, Bani Sadr F, Lalande V, Perronne C and Groupe d'etude sur l'Osteite. 1999. *Mycobacterium kansasii* Septic Arthritis: French Retrospective Study of 5 Years and Review. *Clin Infect Dis*, 29:1455–1460.
31. Bettencourt MV, Bosne-David S and Amaral L. 2000. Comparative *in vitro* activity of phenothiazines against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J of Antimicrob Agents*, 16: 69-71.
32. Biehle J and Cavalieri SJ. 1992. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium kansasii* to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 36: 2039-2041.
33. Bland CS, Ireland JM, Lozano E, Álvarez ME and Primm TP. 2005. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Appl Environ Microbiol*, 71: 5719-5727.

34. Bloch KC, Zwerling L, Pletcher MJ, Hahn JA, Gerberding JL, Ostroff SM, Vugia DL and Reingold AL. 1998. Incidence and clinical implications of isolation of *Mycobacterium kansasii*: results of a 5-year, population-based study. *Ann Intern Med*, 129: 698-704.
35. Blue MI, Payne WG, Mannari RI, Moffitt MR, Walusimbi MG, Robson MC and Pines B. 2002. *Mycobacterium kansasii* causing carpal tunnel syndrome with concomitant pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *South Med J*, 95: 1095-1098.
36. Breathnach A, Levell N, Munro C, Natarajan S and Pedler S. 1995. Cutaneous *Mycobacterium kansasii* infection: case report and review. *Clin Infect Dis*, 20: 812-817.
37. British Thoracic Society, Research Committee. 1994. *Mycobacterium kansasii* pulmonary infection: a prospective study of the results of nine months of treatment with rifampicin and ethambutol. *Thorax*, 49: 435-436.
38. Brown BA, Wallace RJ JR and Onyi GO. 1992. Activities of clarithromycin against eight slowly growing species of nontuberculous mycobacteria, determined by using a broth microdilution MIC system. *Antimicrob Agents Chemother*, 36: 1987-1990.
39. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, Blinkhorn R, Crist CJ and Mann LB. 2001. Successful treatment of disseminated *Mycobacterium chelonae* infection with linezolid. *Clin Infect Dis*, 33: 1433-1434.
40. Brown-Elliott BA, Crist CJ, Mann LB, Wilson RW and Wallace RJ Jr. 2003. *In vitro* activity of linezolid against slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 1736-1738.
41. Buhler VB and Pollak A. 1953. Human infection with atypical acid-fast organisms: report of two cases with pathologic finding. *AM J Clin Path* 23: 363-374. (citado por: Wayne L. 1984. Mycobacterial speciation. In Kubica GP and Wayne LG (eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 25-65. Dekker INC, New York.
42. Calatayud L, Blanco MA, Alcaide F, Santín M, Dorca J, Rufí G, Martín R y GEMKA. 2004. Estudio de la diversidad genotípica y fenotípica de *Mycobacterium kansasii* aislados en España: datos del grupo español de estudio de *Mycobacterium kansasii* (GEMKA). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22 (S1): 172-173.

43. Cardeñosa E, Alcaide F, Calatayud L, Santín M, Dorca J, Martín R y GEMKA. 2006. Evaluación de las características fenotípicas en la identificación de los subtipos del complejo *Mycobacterium kansasii*. Resultados del grupo español de estudio de *M. kansasii* (GEMKA). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24 (Espec Congr): 16
44. Carroll SR, Newsom SWB and Jenner JR. 1984. Treatment of septic arthritis due to *Mycobacterium kansasii*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 289: 591-592.
45. Carson LA, Bland LA, Cusick LB, Favero MS, Bolan GA, Reingold AL and Good RC. (1988). Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. *Appl Environ Microbiol*, 54: 3122-3125.
46. Castro J, Sánchez JM, Fernández A y Antón J. 1998. Infección diseminada por *Mycobacterium kansasii* con afectación cutánea en una paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Med Clin (Barc)*, 110: 598.
47. Chang CT, Wang LY, Liao CY and Huang SP. 2002. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol*, 68: 3159-3161.
48. Chaves A, Torrelo A, Mediero IG, Menéndez-Rivas M, Ortega-Calderón A and Zambrano A. 2001. Primary cutaneous *Mycobacterium kansasii* infection in a child. *Pediatr Dermatol*, 18: 131-134.
49. Chobot S, Malis J, Sebakova H, Pelikan M, Zatloukal O, Palicka P, Kocurova D. 1997. Endemic incidence of infections caused by *Mycobacterium kansasii* in the Karvina district in 1968-1995 (analysis of epidemiological data--review). *Cent Eur J Public Health*, 5: 164-173.
50. Choudhri S, Manfreda J, Wolfe J, Parker S and Long R. 1995. Clinical significance of non tuberculous mycobacteria isolates in a Canadian tertiary care center. *Clin Infect Dis*, 21: 128-133.
51. Christianson LC and Dewlett HJ. 1960. Pulmonary disease in adults associated with unclassified mycobacteria. *Am J Med*, 29: 980-991.
52. Cirilo JD, Falkov S, Tompkins LS and Bermudez LE. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*, 65: 3759-3767.
53. Collins CH, Grange JM and Yates MD. 1984. Mycobacteria in water. *J Appl Bacteriol*, 57: 193-121.

54. Conte JE Jr, Golden JA, Kipps J and Zurlinden E. 2002. Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 1475-1480.
55. Control de Calidad SEIMC. 2005. Análisis Control de Calidad de Micobacterias MB-2/05. *Boletín de Control de Calidad SEIMC*, 17: 37.
56. Cook PP and Christie J. 1999. Unilateral adrenal mass due to *Mycobacterium kansasii* in an AIDS patient. *South Med J*, 91: 981-982.
57. Corkill JE, Graham R, Hart CA and Stubbs S. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. *J Clin Microbiol*, 38: 2791-2792.
58. Cynamon MH, Elliot SA, DeStefano MS and Yeo AET. 2003. Activity of clarithromycin alone and in combination in a murine model of *Mycobacterium kansasii* infection. *J Antimicrob Chemother*, 52: 306-307.
59. Da Silva Telles MA, Chimara E, Ferrazoli L and Riley LW. 2005. *Mycobacterium kansasii*: antibiotic susceptibility and PCR restriction analysis of clinical isolates. *J Med Microbiol*, 54: 975-979.
60. Devallois A, Goh KS and Rastogi N. 1997. Rapid identification of mycobacteria to the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp-65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*, 35: 2969-2973.
61. Dillon JR, Rahman M and Yeung KH. 1993. Discriminatory power of typing schemes based on Simpson's index of diversity for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*, 31:2831-2833.
62. Draper P. 1991. The structure of mycobacterial cell envelope is not yet understood. *Res Microbiol*, 142: 420-422.
63. Echevarría MP, Martín G, Pérez J y Urkijo JC. 1994. Enfermedad pulmonar por *Mycobacterium kansasii*. Presentación de 27 casos (1988-1992). *Enfer Infecc Microbiol Clin*, 12: 280-284.
64. Engel HWB and Berwald LG. 1980a. Phage typing of *Mycobacterium kansasii*. *Tubercle*, 61: 11-19.
65. Engel HWB and Berwald LG. 1980b. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tap water. *Tubercle*, 61: 21-26.
66. Ernst F and van der Auwera P. 1988. *In vitro* activity of fleroxacin (Ro23-6240), a new fluoroquinilone, and other agents, against *Mycobacterium* spp. *J Antimicrob Chemother*, 21: 501-504.

67. Evans AJ, Crisp AJ, Hubbard, Colville A, Evans SA and Johnston ID. 1996a. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection: comparison of radiological appearances with pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 51: 1243-1247.
68. Evans SA, Colville A, Evans AJ, Crisp AJ and Johnston ID. 1996b. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection: comparison of the clinical features, treatment and outcome with pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 51: 1248-1252.
69. Falkinham JO. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 9: 177-215.
70. Fassbender M, Lode H, Schiller C, Andro R, Goetschi B, Borner K and Koeppe P. 1996. Comparative pharmacokinetics of macrolide antibiotics and concentrations achieved in polymorphonuclear leukocytes and saliva. *Clin Microbiol Infect*, 1: 235-243.
71. Feld R, Bodey GP and Groschel D. 1976. Mycobacteriosis in patients with malignant disease. *Arch Inter Med*, 136: 67-70.
72. Fernández de Sevilla T, Alegre J, Fernández A, Pigram C y Martín Vázquez JM. 1988. Adenocarcinoma y tuberculosis pulmonar activa. *Rev Clin Esp*, 192: 393.
73. Fischeider R, Schulze-Robbecke R and Weber A. 1991. Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 192: 154-158.
74. Flint D, Mahadevan M, Barber C, Grayson D and Small R. 2000. Cervical lymphadenitis due to non-tuberculous mycobacteria: Surgical treatment and review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 53: 187-194.
75. Flor A, Capdevila JA, Martin N, Gavalda J and Pahissa A. 1996. Nontuberculous mycobacterial meningitis: report of two cases and review. *Clin Infect Dis*, 23: 1266-1273.
76. Forslow U, Geborek A, Hielte L, Petrini B and Heurlin N. 2003. Early chemotherapy for non-tuberculous mycobacterial infections in patients with cystic fibrosis. *Acta Pediatr*, 92: 910-915.
77. Fraile O, Navalpotro D, Guna R, Matheus E, Jiménez M, Mallea C, Garay A y Borrás R. 2006. Aislamiento de micobacterias en un Hospital terciario. XIV Congreso de la Sociedad Valenciana de Microbiología Clínica. Libro de Comunicaciones, comunicación nº 24.

78. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM and Gilman RH. 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol*, 36: 362-366.
79. Gaafar A, Unzaga MJ, Cisterna R, Clavo FE, Urra E, Ayarza R and Martín G. 2003. Evaluation of a modified single-enzyme amplified fragment length polymorphism technique for fingerprinting and differentiating of *Mycobacterium kansasii* type I isolates. *J Clin Microbiol*, 41: 3846-3850.
80. Gallont JE and Ko AH. 1996. Cavitory pulmonary lesions in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, 22: 671-682
81. Gadre DV and Talwar V. 1999. *In vitro* susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains to trifluoperazine. *J Chemother* 11, (Suppl. 3): 203-206.
82. Garcia-Garcia A, Galvez J, de Julian-Ortiz JV, Garcia-Domenech R, Munoz C, Guna R and Borrás R. 2004. New agents active against *Mycobacterium avium* complex selected by molecular topology: a virtual screening method. *J Antimicrob Chemother*, 53: 65-73.
83. Garcia-Garcia A, Galvez J, de Julian-Ortiz JV, Garcia-Domenech R, Munoz C, Guna R and Borrás R. 2005. Search of chemical scaffolds for novel antituberculosis agents. *J Biomol Scree*, 10: 206-214.
84. Garrós J, García F, Martín G, Lorza JJ y Ruiz de Gordejuela E. 2001. Enfermedad pulmonar por *Mycobacterium kansasii*. Análisis de 39 casos. *Arch Bronconeumol*, 37: 27-34.
85. Gay JD, DeYoung DR and Roberts GD. 1984. *In vitro* activities of norfloxacin and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum* and *M. kansasii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 26: 94-96.
86. Gillespie SH and Billington O. 1999. Activity of moxifloxacin against mycobacteria. *J Antimicrob Chemother* 44, 393-395.
87. Godfrey HP, Feng Z, Mandy S, Mandy K, Huyges J, De Bruya J, Abou-Zeid C, Wiker HG, Nagal S and Tasaka H. 1992. Modulation of expression of delayed hypersensitivity by mycobacterial antigen 85 fibronectin-binding proteins. *Infect Immun*, 60: 2522-2528.
88. Gorse GJ, Fairshter RD, Friedly G, Dela Maza L, Greene GR and Cesario TC. 1983. Nontuberculous mycobacteria disease. Experience in a southern California hospital. *Arch Intern Med*, 143: 225-228.

89. Graybill JR and Bocanegra R. 2001. Treatment alternatives for *Mycobacterium kansasii*. J Antimicrob Chemother, 47: 417-20.
90. Griffith DE, Brown-Elliott BA and Wallace RJ Jr. 2003. Thrice-weekly clarithromycin-containing regimen for treatment of *Mycobacterium kansasii* lung disease: results of a preliminary study. Clin Infect Dis, 37: 1178-1182.
91. Groves RW, Newton JA and Hat RJ. 1991. Cutaneous *Mycobacterium kansasii* infection-treatment with erythromycin. Clin Exp Dermatol 16: 300-302.
92. Guerardel Y, Maes E, Briken V, Chirat F, Leroy Y, Loch C, Strecker G and Kremer L. 2003. Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*: novel structural features and apoptosis-inducing properties. J Biol Chem, 278: 36637-36651.
93. Guna R, Domínguez V, Garay A, Muñoz C, García A, Galvéz J, De Julián V, Borrás R. 2004. Actividad *in vitro* de linezolid frente a *Mycobacterium kansasii*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 22 (Suppl.1): 191.
94. Guna R, Muñoz C, Dominguez V, Garcia-Garcia A, Galvez J, de Julian-Ortiz JV and Borrás R. 2005. *In vitro* activity of linezolid, clarithromycin and moxifloxacin against clinical isolates of *Mycobacterium kansasii*. J Antimicrob Chemother, 55: 950-953.
95. Guna R, Fraile O, Navalpotro D, Garay A, Mallea C, Muñoz C y Borrás R. 2006. Evaluación del Sistema Bactec[®] MGIT 960 para el estudio de sensibilidad de *Mycobacterium kansasii* a los tuberculostáticos de primera línea (P. 659). Enferm Infecc Microbiol Clin, 24 (Especial Congreso): 244.
96. Hauduroy P. 1955. Derniers aspects du monde des mycobacteries. Masson et cie. Paris. (citado por: Wayne L. 1984. Mycobacterial speciation. In Kubica GP and Wayne LG (eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 25-65. Dekker INC, New York).
97. Havelaar AH, Berwald LJ, Groothuis DG and Bass JG 1985. Mycobacteria in semi-public swimming-pools and whirlpools. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B], 180: 505-514.
98. Hawkins JE and Gross WM. 1984. Radiometric drug susceptibility testing of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium marinum*. Programs and abstract of the 24th Interscience Conference Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington DC; abstr. 1200:303.

99. Heifets LB. 1996. Drugs susceptibility testing. *Clin Lab Med*, 16: 641-656.
100. Hernández Flix S, Sauret J, Ausina V, Condom MJ, Rodríguez Frojan G, Luquin M y Cornudella R. 1990. Enfermedad pulmonar por micobacterias ambientales oportunistas. Revisión de 35 casos. *Med Clin (Barc)*, 95: 53-56.
101. Honorato J, Campanero MA y Calahorra B. 1999. Farmacocinética. Tablas-compendio de concentraciones séricas y titulares. En García-Sánchez JE, López R y Prieto J (Eds) *Antimicrobianos en Medicina*. pp: 109-120. Prous Science. Barcelona.
102. Hughes MS, Ball NW, McCarroll J, Erskine M, Taylor MJ, Pollock JM, Skuce RA and Neill SD. 2005. Molecular analyses of mycobacteria other than *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. *Vet Microbiol*, 108: 101-112.
103. Horsburgh CJ Jr and Selik RM. 1989. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis*, 139: 4-7.
104. Huang TS, Shin-Jung Lee S, Tu HZ, Huang WK, Chen YS, Huang CK, Wann SR, Lin HH and Liu YC. 2004. Use of MGIT 960 for rapid quantitative measurement of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex to ciprofloxacin and ethionamide. *J Antimicrob Chemother*, 53: 600-603.
105. Hunter PR and Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26: 2465-2466.
106. Huygen K, Pifliet K, Jurion F, Hilgers J, ten Berg R, Van Vooren PJ and De Bruyn J. 1988. H-2 linked control of *in vitro* gamma interferon production in response to a 32-kilodalton antigen (P32) of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Infect Immun*, 56: 3196-3200.
107. Huys G, Rigouts L, Chemlal K, Portaels F and Swings J. 2000. Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, 38: 3675-3680.
108. Ibarrola M, Baraia-Etxaburu J, Sánchez R, Teira R, Unzaga J y Santamaría J M. 2001. Enfermedad diseminada por *Mycobacterium kansasii* resistente a isoniazida y rifampicina en paciente con sida. *Enf Infecc Microbiol Clin*, 19: 80-82.

109. Iinuma Y, Ichiyama S, Hasegawa Y, Shimokata K, Kawahara S and Matsushima T. 1997. Large-Restriction-Fragment Analysis of *Mycobacterium kansasii* genomic DNA and its applications in molecular typing. J Clin Microbiol, 35: 596-599.
110. Inderlied CB and Nash KA. 2005. Antimycobacterial agents: *in vitro* susceptibility testing and mechanism of action and resistance. In Lorian V (Ed). *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. Chapter 5, pp: 155-225.
111. Jacobson KL, Teira R, Libshitz HI, Raad I, Rolston KWI, Tarrand J and Whimbey E. 2000. *Mycobacterium kansasii* infections in patients with cancer. Clin Infect Dis, 30: 965-969.
112. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M and Kersters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiol, 142: 1881-1893.
113. Jenkins DE, Bahar D and Chofuas I. 1960. Pulmonary disease due to atypical mycobacteria: current concepts. Transactions 19th Conference on Chemotherapy of Tuberculosis: 224-231.
114. Jenkins PA. 1981. The epidemiology of opportunist mycobacterial infections in Wales, 1952-1978. Rev Infect Dis, 3: 1021-1102.
115. Jenkins PA, Banks J, Campbell IA and Smith AP. 1994. *Mycobacterium kansasii* pulmonary infection: a prospective study of the results of nine months of treatment with rifampicin and ethambutol. Thorax, 49: 442-445.
116. Jiménez-Pajares MS, Herrera L, Valverde A, Saiz P y Sáez Nieto JA. 2005. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados de cepas de *Mycobacterium kansasii* aisladas en España (2000-2003). Enferm Infecc Microbiol Clin, 23: 254-258.
117. Joynson DH. 1979. Water: the natural habitat of *Mycobacterium kansasii*?. Tubercle, 60: 77-81.
118. Kaustova J, Olsovsky Z, Kubin M, Zatloukal O, Pelikan M and Hradil V 1981. Endemic occurrence of *Mycobacterium kansasii* in water-supply systems. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 25: 24-30.
119. Kent PT and Kubica GP. 1985. Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Center for Diseases Control and Prevention. Atlanta, Ga.

120. Krüüner A, Yates MD and Drobniowski FA. 2006. Evaluation of MGIT 960-Based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 44: 811-818.
121. Kubica GP. 1984. Clinical Microbiology. In Kubica GP and Wayne LG (eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 133-175. Dekker INC, New York.
122. Leal MV, Gaafar A, Unzaga MJ, Crespo JA, Cisterna R and García F. 2005. Clinical and epidemiological study of disease caused by *Mycobacterium kansasii* in the metropolitan area of Bilbao, Spain. Arch Bronconeumol, 41: 189-196.
123. Le Cabec V, Cols C and Maridonneau-Parini I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. Infect Immun, 68: 4736-4745.
124. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S and Vincent V. 2002. Occurrence of Mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. Appl Environ Microbiol, 68: 5318-5325.
125. León M, Sánchez P, De Diego A y Otero E. 1994. Infección pulmonar por *Mycobacterium kansasii* tras neumonía por citomegalovirus en paciente con trasplante renal. Arch Bronconeumol, 30: 222-225.
126. Levine B and Chaisson RE. 1991. *Mycobacterium kansasii*: a cause of treatable pulmonary disease associated with advanced human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann Intern Med, 114: 861-868.
127. Lévy-Frébault V and Portaels F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int J Syst Bacteriol, 42: 315-323.
128. Lichtenstein IH and MacGregor RR. 1983. Mycobacterial infections in renal transplant recipients: report of five cases and review of the literature. Rev Infect Dis, 5: 216-226.
129. Lillo M, Orengo S, Cernoch P and Harris RL. 1990. Pulmonary and disseminated infection due to *Mycobacterium kansasii*: a decade of experience. Rev Infect Dis, 12: 760-767.
130. Louie M, Jayaratne P, Luchsinger I, Devenish J, Yao J, Schlech W and Simor A. 1996. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and Pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol, 34: 15-19.

131. Maliwan N and Zvetina JR. 2005. Clinical features and follow up of 302 patients with *Mycobacterium kansasii* pulmonary infection: a 50 year experience. *Postgrad Med J*, 81: 530-533.
132. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
133. Marks J. 1975. Occupation and *Kansasii* infection in Cardiff residents. *Tubercle*, 56: 31-313.
134. Martin A, Camacho M, Portaels F and Palomino JC. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agent Chemother*, 47: 3616-3619.
135. Martín-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville-Dufaux M, Feldman K, Havelkova M, Katila ML, Koksalan M, Pererira MF, Rodrigues F, Pyffer GE, Portaels F, Urgell JR, Ruch-Gerdes S, Tortoli E, Vincent V and Watt B. 2004. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 8: 1186-1193.
136. Martínez E, Aparicio J, Cordero P, Sanchis J, Leon M y Perpiñá M. 1995. Coexistencia de carcinoma broncogénico y tuberculosis pulmonar activa. *Arch Bronconeumol*, 31: 32-34.
137. Martinez Moragón E, Menéndez R, Palasí P, Santos M y López Aldeguer J. 2001. Enfermedades por micobacterias ambientales en pacientes con y sin infección por el VIH: características epidemiológicas, clínicas y curso evolutivo. *Arch Bronconeumol*, 37: 281-286.
138. Mayberry JD, Mullins F and Stone OJ. 1965. Cutaneous infection due to *Mycobacterium kansasii*. *JAMA* 194: 1135-1137.
139. McNeil MR and Brennan PJ. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol*, 142: 451-463.
140. Meissner PS and Falkinham III JO. 1986. Plasmid DNA profiles as epidemiological markers for clinical and environmental isolates of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. *J Infect Dis*, 153: 325-331.
141. Minnikin DE. 1991. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. *Res Microbiol*, 142: 423-427.

142. Moise PA, Birmingham MC and Schentag JJ. 2000. Pharmacokinetics and metabolism of moxifloxacin. *Drugs Today (Barc)*, 36: 229-244.
143. Muthuswamy P, Danamudi N and Kocka F. 1992. *In vitro* drug susceptibility of *M. kansasii* isolates from patients with pulmonary and disseminated disease. 92nd Annual Meeting of the American Thoracic Society. Miami Beach, FL. Abstract; A810.
144. Nachamkin I, MacGregor RR, Staneck JL, Tsang AY, Denner JC, Wiltner M and Barbagallo S. 1992. Niacin-positive *Mycobacterium kansasii* isolated from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*, 30: 1344-1346.
145. Nadal C, Pujol RM, Sitjas D, Moragas JM. 1997. Infección cutánea por *Mycobacterium kansasii*. Presentación clínica de dos casos. *Actas Dermosifilgr*, 88: 23-26.
146. Naito M, Ohara N, Matsumoto S and Yamada T. 2005. The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria. *J Biol Chem*, 30: 2905-2909.
147. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard. Approved Standard M24-A, NCCLS, Wayne, PA, USA.
148. Nikaido H and Jarlier V. 1991. Permeability of the mycobacterial cell wall. *Res Microbiol*, 142: 437-443.
149. Padilla E, González V, Manterola JM, Pérez A, Quesada MD, Gordillo S, Vilaplana C, Pallarés MA, Molinos S, Sánchez MD and Ausina V. 2004. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and Genotype *Mycobacterium* assays for identification of *Mycobacterium* species from Mb/bact liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol*, 42: 3083-3088.
150. Pai HH, Chen WC and Peng CF. 2003. Isolation of non-tuberculous mycobacteria from hospital cockroaches (*Periplaneta americana*). *J Hosp Infect*, 53: 224-228.
151. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J and Portaels F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agent Chemother*, 46: 2720-2722.
152. Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SV and Katoch VM. 2004. Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. *Appl Environ Microbiol*, 70: 3751-3753.

153. Parenti DM, Symington JS, Keiser J and Simmon GL. 1995. *Mycobacterium kansasii* bacteremia in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis, 21: 1001-1003.
154. Peyron P, Bordier C, N'Diaye EN and Maridonneau-Parini I. 2000. J Immunol, 165: 5186-5191.
155. Pezzia W, Raleigh JW, Bailey MC, Toth EA and Silverblatt J. 1981. Treatment of pulmonary disease due to *Mycobacterium kansasii*: recent experience with rifampin. Rev Infect Dis, 3: 1035-1039.
156. Picardeau M, Prod'hom G, Raskine L, Lepennec M and Vincent V. 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol, 35: 25-32.
157. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA and Shinnick TM. 1992. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol, 30: 1815-1822.
158. Pollak A and Buhler VB. 1955. The cultural characteristics and animal pathogenicity of an atypical acid-fast organism which causes human disease. Amer. Rev. Tuberc 71: 74-87. (citado por: Wayne L. 1984. Mycobacterial speciation. In Kubica GP and Wayne LG (eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 25-65. Dekker INC, New York).
159. Pressler BM, Hardie EM, Pitulle C, Hopwood RM, Sontakke S and Breitschwerdt EB. 2002. Isolation and identification of *Mycobacterium kansasii* from pleural fluid of a dog with persistent pleural effusion. J Am Vet Med Assoc, 220: 1336-1340.
160. Primm TP, Lucero CA and Flakinham JO 3rd. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin Microbiol Rev, 17: 98-106.
161. Rastogi N. 1991. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. Res Microbiol, 142:464-476.
162. Rastogi N and Barrow WW. 1994. Cell envelope constituents and the multifaceted nature of *Mycobacterium avium* pathogenicity and drugs resitence. Res Microbiol, 145: 243-252.
163. Ratnakar P and Murthy PS. 1992. Antitubercular activity of trifluoperazine, a calmodulin antagonist. FEMS Microbiol Lett, 76: 73-76.

164. Reddy MV, Nadadhur G and Gangadharam P RJ. 1996. *In vitro* and intracellular antimycobacterial activity of trifluoperazine. J Antimicrob Chemother, 37: 196-197.
165. Richter E, Niemann S, Rüscher-Gerdes S and Hoffner S. 1999. Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. J Clin Microbiol, 37: 964-970.
166. Richter E, Rüscher-Gerdes S and Hillemann D. 2006. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. J Clin Microbiol, 44: 1769-1775.
167. Rikimaru T, Kondo M, Kondo S and Oizumi K. 2000. Efficacy of common antiseptics against mycobacteria. Int J Tuberc Lung Dis, 4: 570-576.
168. Rodríguez JC, Ayelo A, Ruiz M, López M y Royo G. 2003. Infección por *Mycobacterium kansasii* en Elche. España. Med Clin (Barc), 120: 253-254.
169. Rodríguez Díaz JC, López M, Ruiz M and Royo G. 2003. *In vitro* activity of new fluoroquinolones and linezolid against non-tuberculous mycobacteria. Int J Antimicrob Agents, 21: 585-588.
170. Römling U and Tümmler B. 2000. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 38: 2791-2792.
171. Rooney G, Nelson MR and Gazzard B. 1996. *Mycobacterium kansasii*: its presentation, treatment and outcome in HIV infected patients. J Clin Pathol, 49: 821-823.
172. Ross BC, Jackson CK, Yang M, Sievers A and Dwyer B. 1992. Identification of genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol, 33: 149-153.
173. Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, and Mauch H. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol, 36: 139-147.
174. Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt R M, Habicht M, Fischer M, and Mauch H. 2000. 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: 1094-1104.

175. Runyon EH. 1955. Veterans administration- National Tuberculosis Association Cooperative Study of mycobacteria. *Amer Rev Tuberc Pulm Dis* 72: 866-868. (citado por: Kubica GP. 1984. *Clinical Microbiology*. In Kubica GP and Wayne LG (Eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 133-175. Dekker INC, New York).
176. Runyon EH. 1958. Mycobacteria encountered in clinical laboratories. *Leprosy Briefs* 9: 21. (citado por: Kubica GP. 1984. *Clinical Microbiology*. In Kubica GP and Wayne LG (Eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 133-175. Dekker INC, New York).
177. Runyon EH. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin. No. Amer* 43: 273-290. (citado por: Kubica GP. 1984. *Clinical Microbiology*. In Kubica GP and Wayne LG (Eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 133-175. Dekker INC, New York).
178. Rüsç-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M and Siddiqi S. 2006. Multicenter laboratory validation of the Bactec MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *J Clin Microbiol*, 44: 688-692.
179. Salfinger M, Hohl P and Kafader FM. 1988. Comparative *in vitro* activity of fleroxacin and other 6-fluoroquinolones against mycobacteria. *J Antimicrob Chemother*, 22 (suppl D): 55-63.
180. Salfinger M and Pfyffer GE. 1994. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13: 961-979.
181. Sancho J y Carrión F. 2002. Infección pulmonar por *Mycobacterium kansasii* y carcinoma broncopulmonar sincrónico. *An Med Int*, 19: 186-188.
182. Santín M, Alcaide F, Benitez MA, Salazar A, Ardanuy C, Podzamczar D, Rufi G, Dorca J, Martín R y Gudiol F. 2004. Incidence and molecular typing of *Mycobacterium kansasii* in a defined geographical area in Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect*, 132: 425-432.
183. Santos R, Oliveiras F, Fernandes J, Goncalves S, Macieira F and Cadete M. 2005. Detection and identification of mycobacteria in the Lisbon water distribution system. *Water Sci Technol*, 52: 177-180.
184. Sauret J, Hernández Flix S and Castro E. 1995. Treatment of pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii*. Results of 18 v.s. 12 months chemotherapy. *Tubercle Lung Dis*, 76: 104-108.

185. Savelkoul PHM, Aarts HJM, De Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L and Lenstra JA. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *J Clin Microbiol*, 37: 3083-3091.
186. Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G and Piccoli P. 2004. Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric Bactec 460TB method. *J Clin Microbiol*, 42: 1109-1114.
187. Schulze-Robbecke R and y Fischeder R. 1989. Mycobacteria in biofilms. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 188: 385-390.
188. September SM, Brozel VS and Venter SN. 2004. Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol*, 70: 7571-7573.
189. Sherer R, Sable R, Sonnenberg M, Cooper S, Spencer P, Schwimmer S, Kocka F, Muthuswamy P and Kallick C. 1986. Disseminated infection with *Mycobacterium kansasii* in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Ann Intern Med*, 105: 710-712.
190. Shimizu M, Okuzumi K, Yoneyama A, Kunisada T, Araake M, Ogawa H and Kimura S. 2002. *In vitro* antiseptic susceptibility of clinical isolates from nosocomial infections. *Dermatology*, 204 (Sup 1): 21-27.
191. Shinnick TM and Good RC. 1994. *Mycobacterial* taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13: 884-901.
192. Shitrit D, Baum GL, Proess R, Lavy A, Bar-Gil Shirit A, Raz M, Shlomi D, Daniele B and Kramer MR. 2006. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection in Israel, 1999-2004. *Chest*, 129: 771-776.
193. Siemion IZ and Wieczorek Z. 2003. Antiadhesive peptides as the inhibitors of *Mycobacterium kansasii* phagocytosis. *Peptides*, 24: 623-628.
194. Singh S P, Salamon H, Lahti C J, Farid-Moyer M and Small P M. 1999. Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 37:1927-1931.
195. Slosarek M, Kubin M and Pokorny J. 1994. Water as a possible factor of transmission in mycobacterial infections. *Cent Eur J Public Health*, 2: 103-105.

196. Sommers HM and Good RC. 1985. *Mycobacterium*. In: Lennette EH. Manual of clinical microbiology (4^a ed). American Society for Microbiology, Washington, p. 280-318.
197. Steadham JE. 1980. High-catalase strains of *Mycobacterium kansasii* isolated from water in Texas. J Clin Microbiol, 11: 496-498.
198. Steadham JE, Stall SK and Simmank JL. 1985. Use of the Bactec system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* and *M. avium* complex. Diag Microbiol Infect Dis, 3: 33-40.
199. Struelens MJ and the members of the European Study Group on Epidemiological markers (ESGEM), of the European Society for Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID). 1999. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiology typing systems. Clin Microbiol Infect, 2: 2-11.
200. Suffys, PN, da Silva Rocha A, de Oliveira M, Dias Campos CE, Werneck Barreto AM, Portaels F, Rigouts L, Wouters G, Jannes G, Van Reybroeck G, Mijs W and Vanderborght B. 2001. Rapid identification of mycobacteria to the species level using the INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. J Clin Microbiol, 39: 4477-4482.
201. Sulochana S, Rahman F and Paravasivan CN. 2005. *In vitro* activity of fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. J Chemother, 17: 169-173.
202. Suzuki Y, Nozaki Y, Nakanishi K, Konoh T, Yoshimoto T and Nishiwaki K. 2005. A rare case of disseminated *Mycobacterium kansasii* infection. Kekkaku, 80: 359-364.
203. Tacquet A et Tison F. 1961. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl-sulfate de sodium. Ann Inst Pasteur, 100 : 676-680.
204. Taillard C, Greub G, Weber R, Pfyffer GE, Bodmer T, Zimmerli S, Frei R, Bassetti S, Rohner P, Piffaretti JC, Bernasconi E, Bille J, Telenti A and Prod'hom G. 2003. Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: swiss national survey. J Clin Microbiol, 41: 1240-1244.
205. Tartaglione T. 1997. Treatment of nontuberculous mycobacterial infection: role of clarithromycin and azithromycin. Clin Ther, 19: 626-638.

206. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC and Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, 31: 175-178.
207. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33: 2233-2239.
208. Thole JE, Schoningh R, Janson AA, Garbe T, Cornelisse YE, Clark-Curtiss JE, Kolk AH, Ottenhoff TH, De Vries RR and Abu-Zeid C. 1992. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol*, 6: 153-163.
209. Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS and Greub G. 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol*, 72 : 2428-2438.
210. Tison F et Carbonnelle B. 1972. Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante. Crouan et Roques, Lille.
211. Tomás S, Pons A, Planas J, Gallen M, Malats N y Botet J. 1990. Diagnóstico sincrónico de cáncer de pulmón y tuberculosis pulmonar activa. *Neoplasia*, 6: 14-16.
212. Tortoli E, Simonetti, Lacchini C, Penati V, Piersimoni C and Morbiducci V. 1994a. Evaluation of a commercial DNA probe assay for the identification of *Mycobacterium kansasii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13: 264–267.
213. Tortoli E, Tullia Simoneyti IM, Lacchini C, Penati V and Urbano P. 1994b. Tentative evidence of AIDS-associated biotype of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol*, 32: 1779-1782.
214. Tortoli E, Simonetti M T and Lavinia F. 1996. Evaluation of reformulated chemiluminescent DNA probe (AccuProbe) for culture identification of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol*, 34: 2838–2840.
215. Tortoli, E., A. Nanetti, C. Piersimoni, P. Cichero, C. Farina, G. Mucignat, C. Scarparo, L. Bartolini, R. Valentini, D. Nista, G. Gesu, C. P. Tosi, M. Crovatto, and G. Brusarosco. 2001. Performance assessment of a new mul-tiplex probe assay for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 39: 1079–1084.

216. Tortoli E, Mariottini A and Mazzei G. 2003. Evaluation of INNO-LiPA Mycobacteria v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol*, 41: 4418–4420.
217. Torvinen E, Suomalainen S, Lehtola MJ, Miettinen IT, Zacheus O, Paulin L, Katila ML and Martikainen PJ. 2004. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl Environ Microbiol*, 70: 1973-1981.
218. Tsai CW, Wang JT, Tsai CC and Yeh KH. 2006. Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection in an HIV-negative patient presenting with mimicking multiple bone metastases. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 54: 211-216.
219. Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J and Portaels F. 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 911-934.
220. Valle MT, Megiovanni AM, Merlo A, Li Pira G, Bottone L, Angelini G, Bracci L, Lozzi L, Huygen K and Manca F. 2001. Epitope focus, clonal composition and Th1 phenotype of the human CD4 response to the secretory micobacterial antigen Ag85. *Clin Exp Immunol*, 123: 226-232.
221. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi RA and Piffaretti JC. 1995. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol*, 33: 1716–1719.
222. Van Looveren M, Ison CA, Ieven M, Vandamme P, Martin IM, Vermeulen k, Renton A and Goossens H. 1999. Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*, 37: 2183–2188.
223. Vignal C, Guerardel Y, Kremer L, Masson M, Legrand D, Mazurier J and Ellass E. 2003. Lipomammans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF- α and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol*, 15: 171: 2014-2023.
224. Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC and Wallace RJ Jr. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA and Tenover JC (eds). *Manual of clinical microbiology*. 8th edition. Vol 1, Chap 37, pp. 560-584. American Society for Microbiology, Washington DC.
225. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, de Lee TV, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407–4414.

226. Wallace RJ Jr, Nash DR, Steele LC and Steingrube VA. 1986. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *J Clin Microbiol*, 24: 976-981.
227. Wallace RJ Jr, Zhang Y, Brown BA, Fraser V, Mazurek Gh and Maloney S. 1993. DNA large restriction fragment patterns of sporadic and epidemic nosocomial strains of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol*, 31: 2697-2701.
228. Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, Onyi G, Dunlap R, Ahn CH and Murphy DT. 1994. Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Clin Infect Dis*, 18: 736-743.
229. Wallace RJ Jr, Glassroth J, Griffith DE, Olivier KN, Cook JL and Gordin F. American Thoracic Society. 1997. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: S1-S25.
230. Wallace RJ Jr, Brown-Elliott BA, Ward SC, Crist CJ, Mann LB and Wilson RW. 2001. Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 764-7.
231. Wayne LG. 1962. Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. *Amer Rev Resp Dis*, 86: 651-656.
232. Wayne LG and Doubek JR. 1964. The role of air in the photocromogenic behaviour of *Mycobacterium kansasii*. *Amer J Clin Path*, 42: 431-433.
233. Wayne L. 1984. Mycobacterial speciation. In Kubica GP and Wayne LG (eds) *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Part A, pp. 25-65. Dekker INC, New York.
234. Wayne LG, Good RC, Krichevsky MI, Blacklock Z, David HL, Dawson D, Gross W, Hawkins J, Levy-Frebault VV, McManus C, Portaels F, Rüsck-Gerdes S, Schröder KH, Silcox VA, Tsukamura M, Van den Breen L and Yakrus MA. 1991. Fourth report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the international Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol*, 41: 463-472.
235. Wieland CW, Florquin S, Pater JM, Weijer S and van der Poll T. 2006. CD4 cells play a limited role in murine lung infection with *Mycobacterium kansasii*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34: 167-173.
236. Wiker HG and Harboe M. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev*, 56: 648-661.

237. Witzig RS and Franzblau SG. 1993. Susceptibility of *Mycobacterium kansasii* to ofloxacin, sparfloxacin, clarithromycin, azithromycin and fusidic acid. *Antimicrob Agents Chemother*, 37: 1997-1999.
238. Wolinsky E and Ryneerson TK. 1968. Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. *Am Rev Respir Dis*, 97: 1032-1037.
239. Wolinsky E. 1979. State of the art: Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis*, 119: 107-159.
240. Wolinsky E. 1995. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin Infect Dis*, 20: 954-963.
241. Woods GL. 2000. Susceptibility testing for mycobacteria. *Clin Infect Dis*, 31: 1209-1215.
242. Wright EP, Collins CH and Yates MD. 1985. *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. *J Hosp Infect*, 6: 175-178.
243. Yang M, Ross BC and Dwyer B. 1993. Identification of an insertion-like element in a subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol*, 31: 2074-2079.
244. Yano T, Okuda S, Kato KI, Kato K and Kishimoto T. 2004. *Mycobacterium kansasii* osteomyelitis in a patient with AIDS on highly active antiretroviral therapy. *Intern Med*, 43: 1084-1086.
245. Yates MD, Pozniak A and Grange JM. 1993. Isolation of mycobacteria from patients seropositive for the human immunodeficiency virus (HIV) in south east England 1984-1992. *Thorax*, 48: 990-995.
246. Yew WW, Piddock LJ, Li MS, Lyon D, Chan CY and Cheng AF. 1994. *In vitro* activity of quinolones and macrolides against mycobacteria. *J Antimicrob Chemother*, 34: 343-351.
247. Zenone T, Boibieux A, Tigaud S, Fredenucci JF, Vincent V, Chidiac C and Peyramond P. 1999. Non-tuberculous mycobacterial tenosynovitis: a review. *Scand J Infect Dis*, 31: 221-228.
248. Zhang Y, Mann LB, Wilson RW, Brown-Elliott BA, Vincent V, Linuma Y and Wallace RJ Jr. 2004a. Molecular analysis of *Mycobacterium kansasii* isolates from the United States. *J Clin Microbiol*, 42: 119-125.
249. Zhang Y, Yakrus MA, Graviss EA, Williams-Bouyer N, Turenne C, Kabani and Wallace RJ Jr. 2004b. Pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* Isolates previously affected by DNA degradation. *J Clin Microbiol*, 42: 5582-5587.

250. Zvetina JR, Maliwan N, Frederick WE and Reyes C. 1992. *Mycobacterium kansasii* infection following primary pulmonary malignancy. Chest, 102: 1460-1463.
251. Zwolska-Kwiek Z, Augustynowicz-kopec E and Zalewska-Schontaler N. 1993. Drug sensitivity of bacillus strains *M. avium-intracellulare* (MAIC), *M. kansasii* cultured from patients with mycobacteriosis before treatment. Pneumonol Alergol Pol, 61: 248-253.