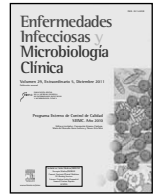




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



## Micobacterias atípicas y su implicación en patología infecciosa pulmonar

Juan J. Camarena Miñana<sup>a,b,\*</sup> y Rosa González Pellicer<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, España

<sup>b</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Micobacterias atípicas no tuberculosas  
Enfermedad infecciosa pulmonar  
Diagnóstico microbiológico  
Estudios de sensibilidad

La incidencia de enfermedad infecciosa pulmonar (EIP) por micobacterias no tuberculosas (MNT) está aumentando de manera significativa en los últimos años. Las MNT son patógenos oportunistas ambientales y su creciente asociación con EIP se debe a factores como mayor exposición a estos microorganismos, aumento de sensibilidad de las técnicas diagnósticas e incremento de pacientes con factores predisponentes. En ocasiones resulta difícil diferenciar si un aislamiento de muestra respiratoria corresponde a una contaminación o está implicado en la patogenia de la enfermedad. Las guías de la American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America combinan criterios clínicos y microbiológicos para un correcto diagnóstico de EIP por MNT. Aunque no validados para todas, sí resaltan la importancia del diagnóstico de especie. La identificación mediante métodos convencionales es la pauta habitual en los laboratorios de microbiología clínica, si bien no siempre permite la diferenciación de especie, debiendo utilizarse en la actualidad nuevos métodos moleculares de hibridación con sondas, amplificación genómica y técnicas de secuenciación. La comunicación clínico-microbiólogo es conveniente para establecer la pauta diagnóstica más adecuada y poder decidir cuándo remitir el aislado al laboratorio de referencia. Aunque el CLSI ha publicado una actualización en las pautas de estudio de sensibilidad *in vitro*, persiste el debate acerca de su utilidad en el manejo de la EIP por MNT. El objetivo de esta revisión es describir las MNT más relevantes en patología pulmonar, los factores predisponentes a esta infección, su diagnóstico mediante nuevas alternativas y la correlación *in vitro* con la respuesta del paciente al tratamiento.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Atypical mycobacteria and pulmonary involvement in infectious diseases

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Nontuberculous mycobacteria  
Pulmonary infectious diseases  
Microbiological diagnosis  
Susceptibility testing

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are increasingly associated with infectious pulmonary disease. NTM are ubiquitous environmental pathogens with high isolation rates worldwide. The greater frequency of NTM associated with pulmonary diseases is probably due to a combination of increased exposure, improved diagnostic methods and an increase in the prevalence of risk factors predisposing individuals to infection. Difficulty may arise in determining whether an isolate from a respiratory sample is in fact a contaminant or a pathogenic organism. The ATS/IDSA guidelines highlight the importance of following microbiological and clinical criteria in making a diagnosis of NTM lung infection. These criteria may not be useful for all NTM and species-level identification is strongly recommended. Mycobacteria identification by conventional methods has been the standard in most clinical microbiology laboratories. However, conventional testing alone does not allow identification of many NTM. Newer, rapid molecular methods such as commercially available nucleic acid probes, genomic amplification and DNA sequence analysis should be used. Communication between the clinician and the laboratorian is essential to decide whether an isolate could be sent to a reference laboratory to determine the best method for species identification. Although the CLSI has recently published an approved standard for NTM susceptibility testing, there is ongoing debate about the role of *in vitro* susceptibility for managing patients with NTM disease. The goal of this review is to describe the mycobacteria involved in lung disease, the factors that predispose to this infection, its diagnosis with alternative procedures and the correlation between *in vitro* and *in vivo* treatment response.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [juan.camarena@uv.es](mailto:juan.camarena@uv.es) (J.J. Camarena Miñana).

## Introducción

La pauta inicial en nuestro entorno ante un paciente con enfermedad infecciosa pulmonar (EIP) de probable etiología micobacteriana se basa en descartar la implicación de *Mycobacterium tuberculosis* complex y resistencias asociadas<sup>1</sup>. Sin embargo, a este planteamiento habría que empezar a pensar en añadirle el estudio de la posible implicación de otras micobacterias en estos procesos. El incremento progresivo de micobacterias atípicas no tuberculosas (MNT) asociadas a EIP<sup>2-4</sup>, especialmente en nuestro medio<sup>5,6</sup>, supone un buen motivo para ello. La EIP por MNT comenzó a describirse de forma ocasional en pacientes inmunodeprimidos y/o con patología pulmonar de base. La asociación *Mycobacterium avium* complex (MAC)-sida y el incremento de casos por otras especies en pacientes de riesgo<sup>7</sup> supone que, en la actualidad, esta patología deba ser considerada un verdadero problema de salud pública<sup>8</sup> asociado a pacientes con diferentes patologías de base en este órgano<sup>4</sup>.

A diferencia de los 2 grupos patógenos (*M. tuberculosis* complex y *Mycobacterium leprae*), las MNT se comportan como patógenos oportunistas ambientales<sup>9</sup>. No se han descrito casos de transmisión entre humanos ni animal-humano<sup>10</sup>, requiriéndose factores predisponentes del huésped para la progresión: contaminación-colonización-infección-enfermedad clínica. El aislamiento de una cepa "atípica" en muestra respiratoria habitualmente contaminante<sup>11</sup> supone estudiar su posible implicación en el cuadro pulmonar, siendo éste uno de los retos que se le presentan con mayor frecuencia al microbiólogo y al clínico, y motivo de esta revisión.

Al no ser infecciones de declaración obligatoria, los datos de extensión y prevalencia son limitados, aunque con evidencias de su incremento no sólo en países desarrollados, sino en el ámbito mundial<sup>2,4,12</sup>. Los criterios que establece el documento de la American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA) son los que han marcado, desde 2007, las pautas de manejo de estos pacientes y que se siguen utilizando en la actualidad<sup>13</sup>. Es, por tanto, tras aplicar estos criterios cuando se confirma y acepta tanto la disminución de la prevalencia de tuberculosis (TB) en determinadas zonas geográficas, principalmente en países industrializados, como el incremento progresivo de casos de EIP por MNT en las distintas áreas estudiadas<sup>14,15</sup>.

## Aspectos epidemiológicos asociados a su incremento

En épocas previas, con prevalencia elevada de TB, el aislamiento de una cepa MNT en muestra respiratoria era considerado como contaminante. Sin embargo, la proporción de enfermedad por TB/MNT se ha ido invirtiendo con el tiempo; a ello ha contribuido la mejora de sensibilidad de los métodos microbiológicos disponibles en la rutina diagnóstica y la descripción de nuevas especies asociadas a casos de EIP<sup>12</sup>.

Estos microorganismos se comportan como contaminantes ambientales en suelo y agua<sup>9</sup>, habiéndose aislado de la red de distribución de agua doméstica, jacuzzis, piscinas y lugares de trabajo, incluyendo hospitales, por su resistencia al cloro y otros desinfectantes, con casos de transmisión a través de broncoscopios contaminados<sup>4</sup>. Se han detectado en torres de refrigeración asociadas a amebas de vida libre<sup>16</sup>, en aerosoles y formando parte de los *biofilms* en puntos como duchas<sup>17</sup>. Como patógenos oportunistas requieren la alteración de los mecanismos de defensa del huésped. Por ello se asocian a alteraciones de la barrera mucosa, casos con enfermedad pulmonar de base (EPOC, bronquiectasias, fibrosis quística, etc.) y/o estados de inmunosupresión (sida, neoplasias, tratamientos inmunosupresores, trasplantados, etc.)<sup>18,19</sup>.

Las especies más prevalentes en EIP<sup>13</sup> involucradas en patología son MAC, *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium kansasii*, a las que se les han añadido otras de reciente descripción o clásicos contaminantes, todas ellas potenciales patógenos oportunistas<sup>20</sup>. Su presencia en cultivo de muestra respiratoria en paciente con sospecha de EIP debe ser interpretada siempre dentro del contexto clínico

atendiendo a las recomendaciones de la ATS/IDSA, donde se especifica que este diagnóstico se basará en evidencias clínicas, radiológicas y microbiológicas<sup>13</sup>. La variabilidad de las especies implicadas parece relacionada con la frecuencia de las micobacterias en cada área geográfica, asociándose a zonas concretas con prevalencia elevada<sup>8</sup>, lo que apoya la teoría del reservorio ambiental. En un análisis general de su distribución mundial, el patógeno predominante en la mayoría de las regiones es MAC, siendo *M. kansasii* relativamente más frecuente en la zona central de Estados Unidos, Europa y Sudáfrica; *Mycobacterium xenopi* en casos descritos en Canadá, Estados Unidos y algunas zonas de Europa; *Mycobacterium malmoense* en Reino Unido y norte de Europa, y *Mycobacterium simiae* en regiones áridas del sudoeste de Estados Unidos, Cuba e Israel<sup>13,19,21</sup>. Es muy probable que sean las variaciones regionales de las condiciones ambientales las que favorezcan diferencias en las poblaciones de MNT predominantes en los reservorios a los que los pacientes susceptibles están expuestos, explicando así estas variaciones geográficas.

Se ha producido un cambio en el perfil de los pacientes con EIP por MNT. Mientras que los trabajos iniciales describen casos habitualmente en varones adultos con tabaquismo, patología pulmonar previa y otros factores predisponentes como alcoholismo<sup>7</sup>, en los últimos 20 años se ha producido un incremento de casos en mujeres que presentan cada vez de forma más habitual cuadros similares. Además, se detectan casos específicos en mujeres posmenopáusicas de raza blanca con factores predisponentes e incluso en pacientes ancianas sin ellos<sup>22</sup>, desarrollando en ocasiones el síndrome de Lady Windermere<sup>23</sup>. Esta predisposición al desarrollo de EIP por MNT se ha asociado a factores genéticos, como ocurre en pacientes con fibrosis quística y déficit de  $\alpha$ -1 antitripsina con bronquiectasias<sup>24,25</sup>, con distintas variaciones en las moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria innata asociadas a infección por *M. abscessus*<sup>26</sup>.

## Principales micobacterias atípicas implicadas y características diferenciales

*Micobacterias no tuberculosas pulmonares. Un tema en constante evolución*

La pauta de manejo de pacientes con sospecha de EIP por MNT sigue los criterios de la ATS/IDSA que se resumen en la tabla 1<sup>13</sup>. Dado el posible aislamiento de MNT oportunista en muestras respiratorias, para un correcto diagnóstico deben cumplirse los aspectos clínicos, radiológicos y microbiológicos en ella referidos. Sin embargo, al ajustarse éstos inicialmente sólo a MAC, *M. kansasii* y *M. abscessus* como especies hasta entonces con mayor relevancia en este tipo de patologías, en el mismo documento se afirma que no hay datos hasta ese momento sobre muchas otras MNT con posible asociación a EIP. Posteriores revisiones al respecto<sup>14</sup> insisten en la necesidad de realizar un adecuado diagnóstico incluyendo otras especies, tanto de crecimiento rápido (*M. abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, grupo *Mycobacterium fortuitum*) como lento (*M. malmoense*, *M. xenopi* o incluso habituales contaminantes como *Mycobacterium gordonae*). El número de especies implicadas sigue ampliándose, de tal forma que, aunque de las aproximadamente 150 MNT descritas hasta la fecha ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr))<sup>27</sup> sólo unas pocas están asociadas a patología pulmonar, en estos últimos años se van describiendo nuevos casos por aislados de *Mycobacterium szulgai*, *M. simiae* o *Mycobacterium celatum*, entre muchos otros<sup>19</sup>. Las distintas MNT, clasificadas según velocidad de crecimiento en cultivo e importancia patogénica, que se han asociado de alguna forma a cuadros de EIP se describen en la tabla 2.

*Principales micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento asociadas a enfermedad pulmonar*

*Mycobacterium avium* complex. De crecimiento lento a 37 °C forma en Löwenstein-Jensen (LJ) colonias pequeñas y lisas inicialmente no

**Tabla 1**  
Criterios clínicos y microbiológicos para el diagnóstico de enfermedad infecciosa pulmonar (EIP) por micobacterias no tuberculosas (MNT). Recomendaciones de la American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA)

<i>Criterios clínicos (se requieren ambos)</i>
Síntomas pulmonares, cavitación o nódulos en radiografía pulmonar, o bronquiectasias multifocales con múltiples nódulos pequeños en TC de alta resolución
Exclusión adecuada de otros diagnósticos posibles (p. ej., tuberculosis)
<i>Criterios microbiológicos (sólo se requiere uno)</i>
Cultivos positivos de al menos 2 muestras seriadas de esputo. Si éstos no son diagnósticos, repetir la baciloscopia y cultivos de esputo de forma periódica
Cultivo positivo de al menos un BAL
Biopsia transbronquial u otra biopsia pulmonar con histopatología propia de presencia de micobacterias (granuloma inflamatorio o BAAR) y cultivo positivo para MNT, o biopsia con características histopatológicas micobacterianas y uno o más esputos, o BAL con cultivo positivo para MNT
Consideraciones a incluir en estos criterios:
Consultar al experto cuando la MNT ha crecido como hallazgo infrecuente o pueda representar una contaminación ambiental
En estos pacientes con sospecha de EIP por MNT pero sin otros criterios diagnósticos deberá pautarse un seguimiento periódico hasta que se pueda establecer o rechazar claramente el diagnóstico
El diagnóstico de EIP por MNT no implica necesariamente la instauración inmediata de tratamiento, y se debe tomar la decisión tras valorar los potenciales riesgos/beneficios de la terapia

BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes; BAL: lavado broncoalveolar; TC: tomografía computarizada.

EIP-MNT cuando se cumplen los 2 criterios clinicorradiológicos y al menos 1 de los microbiológicos (no se han incluido los niveles de evidencia de trabajo original).

Tomada de Griffith et al (2007) con modificaciones.

**Tabla 2**  
Clasificación de micobacterias no tuberculosas (MNT) asociadas a casos de enfermedad infecciosa pulmonar (EIP) en humanos

MNT de crecimiento lento	MNT de crecimiento rápido
<i>M. avium</i> complex	<i>M. abscessus</i> <sup>c</sup>
<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. intracellulare</i>	Grupo <i>M. fortuitum</i>
<i>M. kansasii</i> <sup>a</sup>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. malmoense</i> <sup>a</sup>	<i>M. peregrinum</i>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. fortuitum</i> biovar
<i>M. szulgai</i> <sup>a</sup>	<i>M. mucogenicum</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. immunogenum</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. wolinskyi</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. goodii</i>
Complejo <i>M. terrae</i>	
<i>M. gordonae</i>	
Otras: <i>M. branderi</i> , <i>M. triplex</i> , <i>M. heckeshormense</i> , <i>M. lentiflavum</i> , <i>M. intermedium</i> , <i>M. tusciae</i> <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>Especies frecuentemente asociadas a mayor patogenicidad.

<sup>b</sup>*M. tusciae* causante de infección respiratoria en pacientes con fibrosis quística.

<sup>c</sup>*M. abscessus* considerado actualmente como patógeno pulmonar emergente.

pigmentadas, incluyendo *M. avium* (subespecies *avium*, *colombiense*, *silvaticum*, *hominissuis* y *paratuberculosis*), *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium chimaera*<sup>28,29</sup> asociadas a distintos serotipos con diferencias epidemiológicas, patogénicas y clínicas. *M. avium* (serotipos 1-6, 8-11 y 21) es más frecuente en pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con afectación sistémica, mientras que en VIH negativos se aísla más *M. intracellulare* (serotipos 7, 12-20 y 22-28)<sup>1</sup> con EIP que se presenta con 2 patrones TC distintos: enfermedad fibrocavitada apical o patrón de bronquiectasias nodulares. Su reservorio es ambiental en agua dulce y salada, suelo, polvo, plantas, animales, e incluso en la red de agua potable<sup>30</sup>. Es resistente al cloro y sobrevive en agua con alta concentración de materia orgánica y a temperaturas relativamente elevadas, asociándose a brotes en jacuzzis y duchas<sup>31</sup>. Se distribuye en todo el ámbito

mundial, con mayor frecuencia en regiones templadas de Estados Unidos, Europa, Japón y Sudáfrica<sup>30</sup>. A partir de la pandemia de sida, MAC se convierte en la MNT más frecuentemente asociada a infección diseminada y/o afectación pulmonar, de tracto gastrointestinal o afectación linfática. Su incidencia ha disminuido de forma importante con la introducción de los antirretrovirales, aunque sigue siendo causa común la infección por MNT, tanto pulmonar como diseminada<sup>32</sup>. MAC se ha asociado también al síndrome de Lady Windermere<sup>23</sup> (enfermedad nodular intersticial de lóbulo medio en mujeres mayores posmenopáusicas, no fumadoras y de raza blanca) o a neumonitis hipersensibilizante<sup>33</sup>.

*Mycobacterium kansasii*. Fotocromógena de crecimiento lento, su aislamiento se suele asociar a EIP crónica progresiva con posible cavitación muy similar a TB. De distribución mundial, es una de las MNT más frecuente, con gran variabilidad geográfica<sup>34</sup>, segunda causa en Estados Unidos<sup>15</sup>, en áreas con alta prevalencia de VIH en pacientes con recuentos de CD4 superiores a los casos por MAC y asociada a pseudoepidemias en yacimientos de carbón<sup>35</sup>. De los diferentes subtipos identificados<sup>36</sup>, el I parece ser el predominante en aislamientos clínicos y principal responsable de infección humana<sup>35</sup>. Estudios filogenéticos han demostrado su elevada relación con *Mycobacterium gastri*. Como micobacteria ambiental se aísla principalmente en agua dulce, aunque también en animales y suelo, donde no sobrevive largos períodos. Clínicamente afecta principalmente a varones de raza blanca, mediana edad, historia de alcoholismo y patología pulmonar de base, presentando una clínica similar a TB<sup>37</sup>, con daño estructural crónico del parénquima pulmonar y cavitación apical unilateral, aunque en ocasiones se presenta con un patrón de fibrosis nodular.

*Mycobacterium malmoense*. Micobacteria de crecimiento lento no cromógena descrita en 1997 en Suecia y asociada a EIP crónica en adultos<sup>38</sup>. Se ha recuperado de agua natural y de suelo en lugares como Zaire y Japón, pero su aislamiento en muestras respiratorias se asocia habitualmente a patología pulmonar en el norte de Europa, en especial Reino Unido, Escandinavia, o más recientemente Países Bajos<sup>39</sup>. La British Thoracic Society<sup>38</sup> la describe como responsable del 50% de los casos de EIP por MNT. En un trabajo reciente<sup>39</sup> sobre aislamientos de MNT en esputo con *M. malmoense*, el 80% cumplía los criterios ATS/IDSA de EIP. La manifestación más habitual es la pulmonar, con características de paciente y clínica muy similares a las des-

critas para *M. kansasii*, incluyendo datos radiológicos y cuadro similar a TB<sup>15</sup>.

*Mycobacterium xenopi*. Escotocromógena de crecimiento muy lento, que se caracteriza por su termofilia (crecimiento óptimo a 45 °C) y bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) muy alargados y finos. A nivel ambiental coloniza acumuladores de agua caliente, causa de pseudoepidemias por contaminación de red de agua hospitalaria<sup>40</sup>. Aunque posee capacidad patógena pulmonar, en general, la mayoría de aislamientos clínicos deben considerarse colonizantes o contaminantes, siempre que no cumplan los criterios de la ATS/IDSA<sup>13</sup>. Se ha descrito como agente etiológico de EIP, dependiendo de la zona geográfica, con casos en Europa y áreas de Canadá, siendo más raros en Estados Unidos<sup>41</sup>. En un estudio reciente retrospectivo realizado en Croacia, el 60% de los casos con *M. xenopi* cumplía los criterios de EIP<sup>42</sup>.

*Mycobacterium szulgai*. Especie genéticamente próxima a *M. malmoense*, aunque con fenotipo distinto, de crecimiento lento, escotocromógena a 37 °C y fotocromógena a 25 °C, recuperada rara vez de ambiente, por lo que su cultivo desde muestra clínica posee elevada significación clínica<sup>43</sup>, siendo resistente a la mayoría de los fármacos<sup>44</sup>. Aunque su aislamiento es poco frecuente, se asocia a EIP similar a TB, con cavitación de lóbulo superior, caquexia y tos como síntomas más comunes en varones de mediana edad con factores de riesgo como EPOC, fumadores, alcoholismo y TB pulmonar previa. En un estudio en Países Bajos<sup>45</sup>, en un período de 7 años, el 76% de los casos cumplía los criterios para infección significativa, considerándose la inmunosupresión en los casos VIH/sida un factor de riesgo para infección extrapulmonar.

*Otras micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento asociadas a patología pulmonar*. En la actualidad, el número de MNT implicadas en cuadros pulmonares es cada vez mayor, influyendo en ello la constante descripción de nuevas especies a partir del diagnóstico molecular. Un caso particular lo representa *M. simiae*, productora de niacina al igual que *M. tuberculosis* complex y que comparte características con MAC y con *Mycobacterium scrofulaceum*, por lo que se requiere para su identificación secuenciación de ARN 16S<sup>46</sup>. Aislada por primera vez en 1965 en monos y en agua potable, raramente se había asociado a enfermedad, sugiriendo contaminación ambiental o pseudobrotes por contaminación de agua caliente sanitaria<sup>47</sup>. Se ha asociado a EIP en pacientes con enfermedad pulmonar preexistente o inmunosupresión por sida, en Francia, Alemania, Tailandia y principalmente en el sudeste de Estados Unidos, Cuba e Israel, con infiltrados no cavitados y síntomas inespecíficos<sup>48</sup>. *M. scrofulaceum* necesita también ser confirmada por técnicas moleculares para diferenciación de *Mycobacterium parascrofulaceum*<sup>49</sup>, siendo un patógeno oportunista que ha perdido su protagonismo como causa de linfadenitis cervical, pero del que recientemente se han detectado casos de EIP con presentación similar a TB asociados con exposición ocupacional (a polvo) e historia de tabaquismo<sup>50</sup>. Otras micobacterias de crecimiento lento a considerar son las que se aíslan como contaminantes habituales en muestras respiratorias de pacientes, pero que en determinados casos se han descrito como implicadas en clínica pulmonar (*M. gordonae*, *M. celatum* o el complejo *Mycobacterium terrae*: *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *Mycobacterium triviale* y *Mycobacterium hiberniae*). Entre ellos, *M. gordonae* es la clásica micobacteria contaminante en muestras clínicas, aunque ocasionalmente descrita como causa de infección, especialmente en pacientes con predisposición de base o inmunosupresión (sida, esteroides, carcinoma, diálisis peritoneal o receptores de trasplante)<sup>51</sup>. Hay que diferenciar los posibles pseudobrotes que se producen al estar colonizada el agua del grifo, el hielo, los anestésicos tópicos y/o incluso soluciones antibióticas o desinfectantes, contaminando, como ocurre con otras MNT, las muestras respiratorias<sup>52</sup>. La habitual colonización por *M.*

*celatum* puede acabar en EIP en pacientes con sida o incluso inmunocompetentes, siendo fácil su confusión fenotípica con MAC y *M. xenopi* si no se aplican métodos de diagnóstico molecular. Además, se han descrito reacciones cruzadas entre TB y *M. celatum* al utilizar sondas de AccuProbe (GenProbe, Inc., San Diego, CA)<sup>53</sup>, algo a tener muy presente para no llegar a falso diagnóstico de TB. Otras MNT de crecimiento lento con posible capacidad patogénica descritas en casos aislados de EIP incluyen, entre otras, a *Mycobacterium branderi*, *Mycobacterium triplex*, *Mycobacterium heckeshornense*, *Mycobacterium lentiflavum* y *Mycobacterium intermedium*<sup>1</sup>.

#### *Micobacterias de crecimiento rápido (RGM) asociadas a enfermedad pulmonar*

Agrupan aquellas especies del grupo IV de Runyon que crecen antes de 7 días en LJ<sup>54</sup>. Se aíslan en distintos hábitats acuáticos y del suelo, pudiendo contaminar suministros de agua, reactivos y soluciones de lavado en hospitales. Las 3 especies más importantes en relación con afectación humana son *M. abscessus*, *M. chelonae* y el grupo *M. fortuitum*, aisladas en sistemas de agua fría y que al ser relativamente resistentes a los desinfectantes químicos habituales<sup>55</sup> se han asociado a brotes de infección nosocomial por contaminación de material. En otros casos pueden causar afectación pulmonar con diferencias patogénicas entre ellas, siendo frecuente la resistencia a macrólidos asociada al gen *erm*.

*Mycobacterium abscessus*. Actualmente se considera como un patógeno emergente en casos de afectación pulmonar. Se considera la tercera MNT patógena más frecuentemente aislada en enfermedad pulmonar en Estados Unidos, con variaciones en su distribución regional en el ámbito mundial<sup>56</sup>. Recientes estudios<sup>57</sup> demuestran que *M. abscessus* puede representar más del 80% de las RGM productoras de enfermedad pulmonar, y es la más frecuentemente aislada. Aunque produce EIP, habitualmente se aísla de infección de herida quirúrgica, infección asociada a catéter y dispositivos de hemodiálisis, e infecciones diseminadas en inmunodeprimidos. La manifestación más común en el caso de EIP es la presencia de bronquiectasias fibronodulares, aunque también se han detectado cavitaciones y opacificación. Se ha asociado a reflujo gastroesofágico y fibrosis quística, donde es la segunda MNT más comúnmente aislada por detrás de MAC<sup>10</sup>.

*Mycobacterium chelonae*. Habitualmente se describe en cuadros cutáneos e infecciones postraumáticas, siendo una de las especies con mayor resistencia dentro del grupo de RGM. Se ha asociado a EIP más frecuentemente en inmunodeprimidos con bronquiectasias difusas y nódulos pulmonares, aunque también se ha descrito en enfisemas e incluso en pacientes inmunocompetentes con empiema y fístula broncopulmonar<sup>58</sup>. Resistente a los desinfectantes, puede acabar contaminando soluciones de limpieza de endoscopios asociándose a pseudoepidemias<sup>59</sup>.

*Grupo Mycobacterium fortuitum*. Incluye 3 especies distintas (*M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. fortuitum* biovariedad 3), si bien recientemente se han descrito dentro de este grupo especies como *Mycobacterium alvei* y *Mycobacterium septicum*, entre otras. Su aislamiento rara vez representa una verdadera infección y se debe tener en cuenta el contexto clínico, pudiendo producir una EIP con mejor pronóstico que la infección por *M. abscessus*, siendo más frecuente en pacientes con desórdenes gastroesofágicos.

*Otras micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido*. Se consideran habituales contaminantes ambientales relacionadas con pseudobrotes por contaminación de broncoscopios o, en ocasiones, asociadas a EIP, como ocurre en los casos de *Mycobacterium mucogenicum*, de aspecto mucoso y sensible a múltiples antibióticos; *Mycobacterium immunogenum*, relacionada con *M. abscessus* y *M. chelonae*, por

lo que se necesitan técnicas moleculares para confirmación de especie, y *Mycobacterium smegmatis*, que incluye *Mycobacterium wolinskyi* y *Mycobacterium goodii*, causa rara de infección asociada a linfadenitis, celulitis, osteomielitis, infección de herida o neumonía lipoidea exógena<sup>1</sup>.

### Diagnóstico microbiológico. Planteamientos para identificación de especie

El diagnóstico de EIP por MNT debe basarse en pautas microbiológicas adecuadas para identificación de especie, incluyendo TB o posibles asociaciones en infecciones mixtas. Habitualmente, el paciente presenta neumonía crónica con tos persistente y baciloscopia negativa, siendo el aislamiento a partir del cultivo de muestra respiratoria el primer dato disponible. En casos con poca o nula sintomatología y un solo cultivo positivo sin evidencia clara de patología pulmonar progresiva debe realizarse un control, solicitando cultivos periódicos de esputo. Esta postura, sin embargo, no será la más indicada cuando exista elevada sospecha de MNT, como *M. kansasii* o *M. szulgai*, con una mayor capacidad patogénica, ya que la demora diagnóstica y el retraso terapéutico se asociarán a un peor pronóstico en estos casos<sup>21</sup>.

La toma de muestra se realizará siguiendo protocolos como el de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) para EIP por micobacterias<sup>1</sup>: esputo espontáneo matutino seriado, esputo inducido, jugo gástrico, BAS, BAL, cepillado bronquial con catéter telescópico o incluso biopsia. Tomar de entrada muestras invasivas no parece lo más recomendable<sup>21</sup>, ya que los esputos seriados de rutina presentan buena rentabilidad si se aplican los criterios ATS/IDSA<sup>13</sup> (tabla 1).

La muestra remitida se procesa en cada laboratorio en función de su infraestructura y disponibilidad, debiendo llegar al diagnóstico de especie: tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) o alternativas moleculares aplicadas directamente a la muestra, cultivos sólidos y/o líquidos a distintas temperaturas, identificación fenotípica convencional o molecular y estudios de sensibilidad in vitro. Ante cualquier duda o déficit metodológico se debe remitir el caso a un laboratorio de referencia de micobacterias.

Las pautas tradicionales fenotípicas se siguen utilizando en la práctica habitual, con sus ventajas, indicaciones y limitaciones, debiendo incluir la metodología convencional para diagnóstico de TB y de EIP por MNT a partir de muestra respiratoria. Sin embargo, estos métodos conllevan, generalmente, una demora en la identificación de especie y, por tanto, un retraso en el inicio del correcto manejo del paciente<sup>60</sup>. Por ello, en la actualidad, los laboratorios de micobacterias van incluyendo, cada vez de forma más rutinaria, técnicas moleculares para el diagnóstico de especie bien desde muestra directa, incorporado en la rutina para el diagnóstico de TB (GeneXpert. Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. Cepheid) o bien desde una cepa aislada en el caso de EIP por MNT. En la actualidad, la disponibilidad de diversos sistemas comerciales de identificación molecular nos ayuda a identificar los aislados de forma más rápida y precisa<sup>61</sup>. Además, la inclusión de los estudios de sensibilidad in vitro para MNT siguiendo pautas estandarizadas<sup>29</sup> mejora los planteamientos terapéuticos ante EIP por MNT.

#### Consideraciones al diagnóstico fenotípico en muestra respiratoria

– Las muestras respiratorias para diagnóstico de EIP por micobacterias se descontaminan con productos como el NaOH, a los que las MNT son más sensibles si se comparan con TB<sup>21,60</sup>. Si además tenemos en cuenta que estos casos suelen ser paucibacilares con baciloscopias generalmente negativas y menor coloración con ZN, aumentará la posibilidad de falsos negativos incluso tras cultivo. Sería, por tanto, recomendable en estos casos disminuir el tiempo de descontaminación, especialmente en casos de fibrosis quística, donde se utiliza ácido oxálico al 5% para reducir el sobrecrecimiento

de *Pseudomonas* spp., aunque ello suponga modificar la pauta habitual<sup>21,62</sup>.

- La asociación entre determinadas morfologías al observar BAAR al microscopio óptico a partir de muestra con posibles MNT resulta poco recomendable, aunque puede ser de utilidad desde cultivo en medio líquido. Son clásicas las descripciones de *M. kansasii* con aspecto atigrado, *M. avium* como cocobacilos no agrupados, y *M. xenopi* en forma de bacilos finos y alargados. Recientemente se han descrito cultivos de *M. abscessus* con *cord factor* similar a TB, pudiéndose dar diagnósticos erróneos de TB multirresistente<sup>62</sup>.
- La clasificación de Runyon en los 4 grupos clásicos se realiza a partir del aislamiento en LJ a distintas temperaturas, en función de la velocidad de crecimiento y producción de pigmentos en presencia o ausencia de luz. La necesidad de disminuir el tiempo de diagnóstico de especie nos lleva a utilizar cultivos en medio líquido, con base de Middlebrook 7H9 y suplementos antibióticos y de enriquecimiento, sobre frascos introducidos en sistemas automatizados que mejoran la rentabilidad diagnóstica<sup>12,60</sup>. Estos sistemas se van introduciendo cada vez más en la rutina microbiológica, como el MB/BacT ALERT 3D (bioMérieux) o el BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson), como alternativa o en paralelo a la siembra en cultivo sólido y han contribuido a la disminución del tiempo de crecimiento no sólo en TB, sino también en MNT. Sin embargo, los frascos se incuban a 37 °C, temperatura no adecuada para el crecimiento de especies de interés en este tipo de patologías. La incubación de frascos a 30 °C en el sistema MB/BacT ALERT 3D detectó, en un estudio reciente<sup>63</sup>, el 50% de cepas clínicas de MNT incluidas de forma más rápida que por cultivo habitual a 37 °C. En el caso del BACTEC 960, que incuba a 37 °C, se ha demostrado la utilidad de poner frascos sembrados en MGIT fuera del sistema, a 25-32 °C, ante sospecha de *M. abscessus* o *M. chelonae*, o a 42-45 °C ante posible presencia de *M. xenopi*<sup>61</sup>. La aplicación, a partir del crecimiento obtenido, de sistemas rápidos de identificación por inmunocromatografía para TB (MGIT<sup>™</sup>TbC ID Test Device. BD) o de distintas técnicas moleculares para TB y/o MNT facilitará el diagnóstico de especie así como la detección de infecciones mixtas en casos de EIP.

#### Papel del diagnóstico molecular en la enfermedad infecciosa pulmonar

La utilización exclusiva de métodos tradicionales fenotípicos puede demorar en exceso el proceso o incluso no llegar a identificar la especie implicada, siendo la utilización de métodos moleculares lo que nos proporcionará de forma rápida y precisa esta identificación, tanto sobre muestras clínicas como desde aislado<sup>64</sup>. No hay que olvidar que estas técnicas no deben sustituir completamente a la metodología convencional, que mantiene un importante papel en el diagnóstico micobacteriano.

Los métodos moleculares para identificación de especies implicadas en EIP son múltiples y variados. La disponibilidad de sistemas comerciales, basados principalmente en técnicas de hibridación y/o de amplificación, ha contribuido a su implantación progresiva y generalizada en la "rutina" microbiológica. Sin embargo, será en laboratorios de referencia donde se realicen las técnicas de confirmación necesarias si no se dispone de la infraestructura adecuada o cuando sea necesaria la confirmación de especie. Estas pautas incluyen PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real<sup>65</sup>, PRA, PCR-RFLP (polimorfismo de fragmentos de restricción)<sup>66,67</sup>, secuenciación o ADN-microarrays<sup>68</sup>.

La identificación de especie mediante métodos moleculares a partir de muestra respiratoria es una técnica ya implantada para diagnóstico de TB mediante distintos sistemas estandarizados y comerciales. Sin embargo, su utilidad en EIP por MNT sigue siendo un tema sin resolver. Una baciloscopia positiva de esputo o BAS con PCR en tiempo real para *M. tuberculosis* complex negativa nos alerta de un posible diagnóstico de micobacteriosis pulmonar, aunque en la ma-

yoría de ocasiones éste no se confirmará hasta aislar e identificar la cepa en cultivo, siguiendo los criterios clínicos de la ATS/IDSA. A pesar de ello se han descrito distintas posibilidades para identificación de especie a partir de estas muestras, con el objetivo de obtener resultados con la mayor rapidez posible. Son pocos los casos que requieren esta urgencia, aunque siempre resulta interesante disponer de métodos rápidos que acorten el proceso. Recientemente se han publicado algunos trabajos al respecto utilizando técnicas de *triplex*-PCR sobre muestra respiratoria, amplificando la región intergénica 16S-23S del rADN<sup>69</sup>, PCR sobre tejido pulmonar parafrinado amplificando el gen *hsp65*<sup>70</sup> o asociación en sistemas comercializados (Cobas Amplicor®-Roche) para detección en paralelo de TB y MNT de distintas muestras, algunas respiratorias<sup>71</sup>. Mención especial merece el intento de identificación de especie sobre muestra respiratoria mediante técnicas de hibridación en fase sólida sobre tiras de nitrocelulosa. Aunque la utilidad de estos sistemas sobre cepa aislada ha sido ampliamente demostrada, se han desarrollado alternativas de aplicación directa sobre muestra (GenoType® Mycobacteria Direct-HAIN LIFESCIENCE) para detección simultánea de TB, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y/o *M. malmoense*. En un estudio reciente<sup>72</sup> se describen sensibilidades y especificidades por encima del 90% tras aplicación de esta metodología sobre muestras de esputo con TB y/o MNT, aunque el trabajo concluye que serán necesarios más estudios para poder evaluar de forma precisa la utilidad de estas técnicas.

Donde sí han contribuido de forma importante estos métodos moleculares ha sido en la correcta identificación de especie y, por tanto, en el mejor manejo de EIP por MNT a partir de cepa aislada. El primer sistema implantado en rutina para diagnóstico molecular de micobacterias fue la hibridación en tubo con sondas no radiactivas (AccuProbe-bioMérieux), que permite la identificación rápida, en 2 h, de *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*, convirtiéndose en su momento en uno de los métodos de referencia para detección e identificación de estas especies a partir de aislados en cultivo sólido y/o crecimiento en medio líquido<sup>73</sup>, con la limitación de poderse aplicar sólo a las especies referidas y con sospecha previa de éstas. En la actualidad, este sistema está siendo desplazado por los 2 sistemas comerciales actualmente automatizados de hibridación en fase sólida, basados en sondas cortas de ADN específico de especie presentado en soporte de tiras de nitrocelulosa: el INNO-LiPA (INNO-LiPA Mycobacteria® v.2 INNOGENETICS), basado en la amplificación del espacio 16S-23S, y el GenoType (GenoType® HAIN LIFESCIENCE) con amplificación del 23S rADN, ambos con buena sensibilidad y especificidad, tanto desde medio sólido como líquido, con resultados en 5-6 h, que detectan en una sola prueba gran variedad de especies y posibles coinfecciones por distintas especies<sup>74</sup>. El INNO-LiPA v.2 proporciona una rápida identificación del género *Mycobacterium* y de 16 especies distintas a partir de cultivo, asociadas prácticamente todas ellas con posible EIP, incluyendo *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum* + *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum* (complejo MAI), *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, el complejo *M. fortuitum* y *M. smegmatis*, con capacidad además para discriminar subgrupos dentro de *M. kansasii* y *M. chelonae*. El GenoType® Mycobacterium (HAIN Lifescience GMBH, Nehren, Germany) utiliza para identificación a partir de cultivo 2 tipos de tiras para distintas especies CM/AS, la mayoría asociadas a EIP. El sistema CM ("micobacterias comunes") permite la detección y discriminación de 13 especies de MNT, además de *M. tuberculosis* complex a partir de cultivo. Estas especies son *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. peregrinum* y *M. xenopi*. El sistema AS ("especies adicionales") permite la posterior diferenciación de otras especies de MNT, pudiendo detectar *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastris*, *M. asiaticum* y *M. shimoidei*. Su uti-

lidad se ve reflejada en el trabajo de Couto et al<sup>75</sup>, ya que el sistema identifica el 96,6% de las MNT aisladas, en un período de 3 años, en más de 1.000 pacientes estudiados.

Hay casos en los que habrá que recurrir a técnicas moleculares más complejas para identificación de MNT, lo que en general nos obliga a remitir la cepa a centros de referencia<sup>76</sup>. En las técnicas de hibridación con posterior restricción (PRA, PCR-RFLP) o secuenciación, es importante la elección de la secuencia diana, siendo la más estudiada el gen *hsp65*, regiones genómicas de subunidad ribosomal 16S o intergénica 16S-23S<sup>69,77</sup>. Las indicaciones, ventajas y limitaciones de estas técnicas son en la actualidad objeto de estudio, siendo el laboratorio de referencia el que decidirá el método más adecuado en cada caso, permitiendo incluso la diferenciación entre tipos genéticos dentro de una misma especie<sup>67</sup>. Una última aplicación molecular es la caracterización genotípica de aislados de MNT de un mismo paciente con sospecha de EIP por MNT en diferentes muestras. La confirmación de identidad clonal y de persistencia de una cepa se realizará mediante RFLP utilizando distintas secuencias de inserción según la micobacteria estudiada, IS1245 en *M. avium*, IS1652 en *M. kansasii*, IS1081 e IS1395 en *M. xenopi* o IS1511 e IS1512 en *M. gordonae*<sup>1</sup>.

## Estudios de sensibilidad y terapéutica antimicrobiana

### Cuándo y cómo plantear los estudios de sensibilidad in vitro

Ante un diagnóstico confirmado de EIP por MNT aplicando los criterios establecidos son varios los problemas que se plantean aun siguiendo las pautas propuestas<sup>44</sup>. La afirmación, ya comentada en las guías<sup>13</sup>, de que los resultados de los estudios in vitro no siempre muestran una clara correlación con la posible eficacia clínica del tratamiento recomendado sigue siendo válida. Por tanto, se debe valorar la justificación para implantar terapias antimicrobianas de larga duración en pacientes con patología de base importante y si éstas compensan los posibles efectos adversos. El inicio de la terapia en EIP por MNT no supone, en general, con algunas excepciones, ninguna urgencia, debiendo tomarse tiempo para observar, revisar y consultar cada caso<sup>21</sup>.

Un problema habitual en la rutina microbiológica es la elección del método utilizado para estudio de sensibilidad frente a MNT. En estos casos se deberá emplear el que cumpla los criterios de los CLSI<sup>29,78</sup> para pruebas de susceptibilidad de MNT, que utiliza como estándar la microdilución en caldo Mueller-Hinton ajustado catiónicamente (CAMHB) añadiendo un 5% de OADC para las de crecimiento lento. En este documento, el M24-A2, se desarrollan las pautas y criterios de interpretación de los distintos antimicrobianos frente a cepas tanto de crecimiento lento (MAC, *M. kansasii* y *M. marinum*) como rápido (grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*), dando pautas para un grupo "miscelánea" que incluye *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. simiae* y *M. terrae/nonchromogenicum*. El laboratorio informará de los resultados en categorías (sensible, intermedio o resistente) y en casos determinados indicará la concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/l. Los laboratorios de micobacterias han ido incorporando distintos métodos comerciales de fácil utilización en la rutina microbiológica, que intentan además adecuarse a los criterios del método de referencia<sup>29</sup>. Es el caso de sistemas de microdilución en caldo (Sensititre TREK Diagnostic Systems) disponibles para RGM (RAPMYCO Sensititre) y MNT de crecimiento lento (SLOMYCO Sensititre)<sup>79</sup>, métodos basados en Etest desarrollados para MNT de crecimiento lento y ampliamente utilizados para testar las RGM, o los sistemas automatizados para cultivo en medio líquido, como el BACTEC MGIT 960, introduciendo en los frascos antimicrobianos a distintas concentraciones partiendo de sustancia valorada, tanto para *M. tuberculosis* complex<sup>80,81</sup> como para micobacterias como *M. kansasii*<sup>82</sup>.

Los estudios de sensibilidad in vitro para MNT en estos casos de EIP se deben realizar en laboratorios con infraestructura y metodolo-

**Tabla 3**  
Criterios de interpretación y antimicrobianos en el estudio de sensibilidad in vitro ante enfermedad infecciosa pulmonar por *Mycobacterium avium* complex (MAC) o *M. kansasii* (CLSI, 2011)

Especie	Antimicrobiano	CMI (mg/l) <sup>a</sup>			
		S	I	R	
MAC <sup>b</sup>	Primera línea	Claritromicina <sup>c</sup>	≤ 8	16 <sup>d</sup>	≥ 32
	Secundarios	Moxifloxacino	≤ 1	2	≥ 4
		Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
<i>M. kansasii</i> <sup>e</sup>	Primera línea	Rifampicina <sup>f</sup>	–	–	> 1
	Secundarios	Claritromicina <sup>g</sup>	–	–	> 16
		Amikacina	–	–	> 32
		Ciprofloxacino <sup>h</sup>	–	–	> 2
		Ethambutol	–	–	> 4
		Isoniazida <sup>i</sup>	–	–	–
		Linezolid	–	–	> 16
		Moxifloxacino	–	–	> 2
		Rifabutina	–	–	> 2
		Streptomina <sup>i</sup>	–	–	–
		Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	–	–	> 2/38

CMI: concentración mínima inhibitoria.

<sup>a</sup>Valores de CMI para el método de dilución en caldo CAMHB (pH 7,3-7,4) con 5% de OADC.

<sup>b</sup>MAC: no se recomienda determinar los puntos de corte de antimicrobianos como EMB, RMP, rifabutina, SM o amikacina a pesar de su posible utilidad clínica.

<sup>c</sup>Se debe ensayar claritromicina, siendo el resultado aplicable a azitromicina.

<sup>d</sup>Si la cepa es intermedia a macrólido se debe indicar la posibilidad de resistencia emergente y controlar el caso.

<sup>e</sup>*M. kansasii*: sólo se consideran los valores indicativos de resistencia.

<sup>f</sup>En pacientes con inhibidores de proteasa las cepas sensibles a RMP se asume que son sensibles a rifabutina.

<sup>g</sup>Claritromicina se considera de primera línea en *M. kansasii* en pacientes con pautas cortas y/o intermitentes con RMP, EMB y claritromicina. En los casos con pauta de elección (RMP, EMB, INH) la claritromicina sería un fármaco secundario que representa al grupo de macrólidos activos (claritromicina, azitromicina).

<sup>h</sup>Ciprofloxacino y levofloxacino son intercambiables, con menor actividad in vitro que moxifloxacino.

<sup>i</sup>INH y SM pueden usarse clínicamente pero los puntos de corte para sensibilidad/resistencia en MNT no están establecidos, habiéndose modificado los valores INH 5 mg/l y SM 10 mg/l del documento previo M24-A y debiéndose informar sólo el valor de la CMI sin interpretar.

gía adecuadas, si bien la correcta aplicación de sistemas comerciales contrastados puede ser de utilidad para detección más rápida de resistencias a antimicrobianos de primera línea. En los casos resistentes o ante cualquier limitación, todo aislado deberá ser remitido a un laboratorio de referencia que confirme los resultados. Establecer una buena comunicación entre el clínico y el microbiólogo será, de todas formas, un primer y esencial paso para llegar a un adecuado planteamiento del manejo del caso a resolver<sup>83</sup>.

#### Pautas en micobacterias pulmonares de crecimiento lento

Una interesante aproximación a la terapia antimicrobiana para EIP por MNT de crecimiento lento es la planteada por Cook<sup>21</sup>, que resume los siguientes puntos: *a*) importancia del papel de la claritromicina (azitromicina) y detección inicial de casos resistentes; *b*) efecto sinérgico del etambutol (EMB) en pautas con asociación de antimicrobianos; *c*) papel de rifampicina (RMP)/rifabutina en regímenes con 3 fármacos; *d*) aminoglucósido (amikacina o estreptomina-SM) como tratamiento parenteral adicional, considerando riesgo/beneficio en cada caso; *e*) planteamiento de terapia intermitente frente a tratamiento diario, y *f*) completar al menos 12 meses de tratamiento tras negativización de cultivo de esputo.

*Mycobacterium avium* complex. La historia del tratamiento de EIP por MNT ha ido ligada a la asociación inicial MAC/sida, donde la introducción de macrólidos como tratamiento de elección ha supuesto la instauración de pautas distintas en función de la extensión de la infección y/o gravedad del caso. Aunque en general los estudios de sensibilidad ante infección por MAC muestran una utilidad limitada,

con escasa correlación con la respuesta clínica, los macrólidos (claritromicina de entrada o azitromicina en determinadas circunstancias) son una excepción, al ser tratamiento de elección siempre que el antibiograma no demuestre resistencia in vitro. En los casos de EIP por MAC se recomienda asociar un macrólido (claritromicina o azitromicina) con EMB y RMP, utilizándose distintas dosis según la clínica y especie implicada<sup>44</sup>. Así, en las formas fibrocavitadas o extensas se recomienda asociar además amikacina o SM en los 2-3 primeros meses, debiéndose en todo caso controlar la negativización del esputo, que se producirá tras 3-6 meses de tratamiento, manteniéndolo durante al menos 12 meses. Aunque no hay consenso claro al respecto, los estudios de sensibilidad in vitro ante infección por MAC se deben indicar al menos en situaciones definidas por los ATS/IDSA y confirmadas en el último documento M24-A2 que incluyen aislados clínicos de pacientes en tratamiento previo con macrólidos, con desarrollo de bacteriemia durante profilaxis con éstos, recaídas durante terapia y/o aislamientos de sangre, tejido o de muestra respiratoria significativa. En todos ellos se debe establecer el valor inicial de la CMI de la cepa frente a claritromicina. En pacientes con EIP crónica, el estudio de sensibilidad se repetirá a los 6 meses si no muestra mejoría clínica o si el cultivo de muestra respiratoria persiste positivo. En casos con resistencia a macrólidos o pacientes con intolerancia a éstos se estudiará la sensibilidad in vitro a moxifloxacino y linezolid, antimicrobianos secundarios para los que se proponen puntos de corte<sup>29</sup> (tabla 3). En caso de MAC resistente a claritromicina se utiliza como alternativa amikacina o SM, asociando EMB y RMP o rifabutina. En todos ellos los datos de CMI in vitro han mostrado muy pobre correlación con la respuesta clínica, por lo que su estudio de sensibilidad no estaría indicado. Ante fallo terapéutico, falta de respuesta o

reinfección en EIP por MAC que persiste en zona localizada en pulmón se deberá considerar la posibilidad de resección quirúrgica.

*Mycobacterium kansasii*. Los antimicrobianos utilizados en la pauta terapéutica habitual son isoniazida (INH), RMP y EMB, siendo la pauta para el tratamiento de EIP en estos casos la asociación de RMP (o rifabutina en VIH tratados con inhibidores de la proteasa) con INH y EMB hasta completar 12 meses tras negativización del cultivo de muestra respiratoria<sup>44</sup>. La asociación de RMP, EMB y claritromicina también se ha mostrado efectiva<sup>13</sup>. El fallo terapéutico se asocia en general a incrementos de CMI (resistencia) a RMP y, en ocasiones, a INH y/o EMB<sup>84</sup>. Como alternativa se recomienda la asociación de claritromicina (no aprobada por la FDA para uso en tratamiento de *M. kansasii*) con una quinolona (levofloxacino o moxifloxacino) y EMB<sup>29</sup>.

Dada la asociación fallo terapéutico-resistencia a rifampicina se recomienda la realización de estudios de sensibilidad de primera línea a RMP y claritromicina, aunque esta última se utilice como alternativa (tabla 3). Aunque el método recomendado es la microdilución en caldo con CAMHB suplementado con un 5% de OADC, se han utilizado otras alternativas que incluyen los sistemas automatizados como, por ejemplo, el SIRE de BACTEC 960 MGIT o el método clásico de las proporciones. Hay que tener presente que las concentraciones de RMP que éstos utilizan (1 mg/l) y EMB (5 mg/l) podrían ser adecuadas para inhibir una cepa salvaje, ya que el rango descrito va de 0,5 a 5 mg/l, por lo que estos sistemas no son recomendables. Los estudios de sensibilidad deben repetirse para confirmación en caso de que el cultivo permanezca positivo a los 3 meses de la pauta terapéutica inicialmente adecuada. Entonces se recomienda la utilización de antimicrobianos de segunda línea, que se confirman como activos tomando como valores de resistencia los indicados en la tabla 3, aunque la experiencia con éstos en el caso de *M. kansasii* es todavía limitada.

*Otras micobacterias de crecimiento lento*. En los casos de EIP por MNT de crecimiento lento distintos a MAC y *M. kansasii* (p. ej., *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. simiae* o incluso *M. terrae*) se recomienda en el documento M24-A2<sup>29</sup>, a diferencia de las pautas de la ATS/IDSA<sup>13</sup>, la posibilidad de realizar estudios de sensibilidad y criterios de interpretación similares a *M. kansasii*, aunque la pauta a seguir no está establecida, siendo pocos los trabajos realizados que correlacionen los datos obtenidos. Además, el crecimiento óptimo de *M. xenopi* a 42-45 °C hace que la interpretación de los resultados sea en este caso más problemática. No se ha incluido en este punto *M. marinum*, con recomendaciones específicas en el documento, ya que rara vez produce EIP. Para otras EIP por MNT poco frecuentes (*M. goodii*, *M. scrofulaceum*, *M. haemophilum*, *M. intermedium*, *M. tusciae* en pacientes con fibrosis quística) por *M. szulgai* resistente a la mayoría de fármacos o *M. celatum* por su posible confusión con TB y otras MNT, no se recomiendan de entrada estudios de sensibilidad in vitro, aunque sí se han establecido algunas pautas de manejo terapéutico<sup>44,85,86</sup>.

#### Pautas en micobacterias pulmonares de crecimiento rápido

El planteamiento terapéutico de la EIP por RGM suele ser más complejo, con beneficio incierto a largo plazo y limitado por su elevado coste y efectos adversos<sup>21</sup>. Otros factores que intervienen en su pronóstico son: a) el posible aislamiento simultáneo de MAC en esputo hasta en un 15% de los casos; b) la aparición de cepas con gen *erm*, regulador de resistencia inducible a macrólidos y causante de resistencias in vivo<sup>15,87,88</sup>; c) la mayor actividad de tobramicina y resistencia a cefoxitina de *M. chelonae*, y d) la necesidad de considerar resección pulmonar quirúrgica en enfermedad persistente localizada. Las recomendaciones para el estudio de sensibilidad in vitro en RGM se basan en datos de estudios sobre el grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*, aunque son aplicables a otras RGM con significación clínica. El método estándar utilizado es la microdilución

**Tabla 4**

Criterios de interpretación de estudios de sensibilidad en microdilución en caldo para micobacterias de crecimiento rápido (RGM) (CLSI, 2011)

Antimicrobiano	CMI (mg/l)		
	S	I	R
Amikacina <sup>a</sup>	≤ 16	32	≥ 64
Cefoxitina	≤ 16	32-64	≥ 128
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Claritromicina <sup>b</sup>	≤ 2	4	≥ 8
Doxiciclina	≤ 1	2-4	≥ 8
Imipenem <sup>c</sup>	≤ 4	8-16	≥ 32
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
Meropenem	≤ 4	8-16	≥ 32
Moxifloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT) <sup>d</sup>	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Tobramicina <sup>e</sup>	≤ 2	4	≥ 8

<sup>a</sup>Los aislamientos de *M. abscessus* con CMI ≥ 64 mg/l para amikacina deben volverse a ensayar y si persiste esta CMI informar añadiendo 2 comentarios: a) CMI mayor a la esperada para esta especie, y b) notificar al laboratorio si el fármaco va a utilizarse en el tratamiento del paciente para valorar su remisión a laboratorio de referencia.

<sup>b</sup>Las EIP causadas por cualquier RGM no deben ser tratadas en monoterapia con claritromicina.

<sup>c</sup>Los puntos de corte para imipenem deben considerarse como pendientes de posteriores estudios. Si la CMI es > 8 para *M. fortuitum* grupo, *M. smegmatis* grupo y *M. mucogenicum*, el ensayo deberá repetirse con incubación de la placa no inferior a 3 días. Imipenem presenta mayor actividad frente a RGM que meropenem y ertapenem.

<sup>d</sup>En SXT la CMI viene dada por el 80% de inhibición de crecimiento.

<sup>e</sup>Tobramicina se utiliza principalmente para tratamiento por *M. chelonae* debiéndola confirmar si la CMI es > 4 mg/l. No se debe utilizar para infecciones por *M. fortuitum* grupo ni por *M. abscessus*.

en caldo a 28-30 °C, aunque habitualmente se utilizan los sistemas RAPMYCO (Sensititre) y/o Etest.

En el caso de EIP por *M. abscessus* o *M. chelonae*, donde en función del antibiograma se puede utilizar claritromicina asociada a amikacina, cefoxitina o fluorquinolona durante 6 meses, la curación es difícil y, a menudo, sólo se consigue evitar su progresión. *M. fortuitum* es más sensible a la mayoría de los antimicrobianos, aunque el tratamiento requiere al menos la asociación de 2 fármacos (levofloxacino o moxifloxacino, amikacina, cefoxitina o imipenem) durante un mínimo de 1 año tras negativización del cultivo<sup>44</sup>. Los criterios de interpretación y antimicrobianos recomendados figuran en la tabla 4. Para detección de resistencia a claritromicina (CMI ≥ 8 mg/l) las lecturas deben demorarse, en caso necesario, hasta 14 días, siendo especialmente problemáticas las infecciones por *M. abscessus* con esta resistencia, al tratarse de aislados en general resistentes a todos los antimicrobianos orales indicados, asociándose a fallos de tratamiento en casos de EIP<sup>89</sup>.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Bibliografía

- Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Vol. 9a. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2005. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>
- McGrath EE, Anderson PB. Increased prevalence of nontuberculous mycobacteria infection. *Lancet*. 2007;370:28.
- Thomson RM. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16:1576-83.



4. Winthrop KL, McNelley E, Kendall B, Marshall-Olson A, Morris C, Cassidy M, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:977-82.
5. Raga S, Urra E, Antóñana JM, Soria LM, Vilar B, López JI, et al. Infección pulmonar por micobacterias no tuberculosas en Vizcaya durante un período de 5 años. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28 Espec Congr:18-349 (P. 350).
6. Blázquez MA, Barón R, Hernández M, Ospina N, Caminero JA, Campos MI. Enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas en un período de 13 años. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Espec Congr:21-343 (P. 319).
7. Martínez S, McAdams HP, Batchu CS. The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *Am J Res.* 2007;189:177-86.
8. Falkinham JO III, Iseman MD, De Haas P, Van Soolingen D. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J Water Health.* 2008;6:209-13.
9. Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med.* 2002;23:529-51.
10. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ Jr, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, et al. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:828-34.
11. Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:906-10.
12. Glassroth J. Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Chest.* 2008;133:243-51.
13. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:367-416.
14. McGrath EE, McCabe J, Anderson PB. Guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary non-tuberculous mycobacteria infection. *Int J Clin Pract.* 2008;62:1947-55.
15. McGrath EE, Blades Z, McCabe J, Jarry H, Anderson PB. Nontuberculous Mycobacteria and the lung: from suspicion to infection. *Pub.* 2010;188:269-82.
16. Pagnier I, Merchat M, Raoult D, La Scola B. Emerging *Mycobacteria* spp. in cooling towers. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:121-2.
17. Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, Pace NR. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:16393-9.
18. Hoiby N, Pressler T. Emerging pathogens in cystic fibrosis. *Eur Respir Mon.* 2006;35:66-78.
19. Taiwo B, Glassroth J. Nontuberculous mycobacterial lung diseases. *Infect Dis Clin N Am.* 2010;24:769-89.
20. Fowler SJ, French J, Screaton NJ, Foweraker J, Condliffe A, Haworth CS, et al. Nontuberculous mycobacteria in bronchiectasis: prevalence and patient characteristics. *Eur Respir J.* 2006;28:1204-10.
21. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *British Medical Bulletin.* 2010;96:45-59.
22. Colombo RE, Hill SC, Claypool RJ, Holland SM, Olivier KN. Familial clustering of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease. *Chest.* 2010;137:629-34.
23. Tutor-Ureta P, Mellor-Pita S, Yebra-Bango M, Vargas JA. Bronquiectasias en el lóbulo medio e infección por *Mycobacterium avium* complex: síndrome de Lady Windermere. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:590-4.
24. Kim JS, Tanaka N, Newell JD, Degroote MA, Fulton K, Huitt G, et al. Nontuberculous mycobacterial infection: CT scan findings, genotype, and treatment responsiveness. *Chest.* 2005;128:3863-9.
25. Chan ED, Kaminska AM, Gill W, Chmura K, Feldman NE, Bai X, et al. Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and ATT inhibits *Mycobacterium abscessus* infection of macrophages. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:690-6.
26. Chan ED, Bai X, Kartalija M, Orme IM, Ordway DJ. Host immune response to rapidly growing mycobacteria, an emerging cause of chronic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43:387-93.
27. Johnson MM, Waller EA, Leventhal JP. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2008;14:203-10.
28. Tortoli E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;48:159-78.
29. CLSI. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard- second edition. CLSI document M24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011. Vol. 31 No. 5. Replaces M24-A. Vol. 26 No 23.
30. Inderlied CB, Kemper CA, Bermúdez LE. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6:266-310.
31. Sugita Y, Ishii N, Katsuno M, Yamada R, Nakajima H. Familial cluster of cutaneous *Mycobacterium avium* infection resulting from use of a circulating, constantly heated bath water system. *Br J Dermatol.* 2000;142:789-93.
32. Crump JA, Van Ingen J, Morrissey AB, Boeree MJ, Mavura DR, Swai B, et al. Invasive disease caused by nontuberculous mycobacteria, Tanzania. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:53-5.
33. Cappelluti E, Fraire AE, Schaefer OP. A case of "hot tub lung" due to *Mycobacterium avium* complex in an immunocompetent host. *Arch Intern Med.* 2001;163:845-8.
34. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville-Dufaux M, et al. Nontuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8:1186-93.
35. Marras TK, Daley CK. A systematic review of the clinical significance of pulmonary *Mycobacterium kansasii* isolates in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;36:883-9.
36. Taillard C, Greub G, Weber R, Pfyffer GE, Bodmer T, Zimmerli S, et al. Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss National Survey. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1240-4.
37. Smith MB, Molina CP, Schnadig VJ, Boyars MC, Aronson JF. Pathologic features of *Mycobacterium kansasii* infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:554-60.
38. Research Committee of the British Thoracic Society. First randomised trial of treatments for pulmonary disease caused by *M. avium intracellulare*, *M. malmoense*, and *M. xenopi* in HIV negative patients: rifampicin, ethambutol and isoniazid versus rifampicin and ethambutol. *Thorax.* 2001;56:167-72.
39. Hoefsloot W, Van Ingen J, De Lange WC, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, Van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* isolation in The Netherlands. *Eur Respir J.* 2009;34:926-31.
40. Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1998;52:453-90.
41. Jenkins PA, Campbell IA. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium xenopi* in HIV-negative patients: five year follow-up of patients receiving standardised treatment. *Respir Med.* 2003;97:439-44.
42. Marusic A, Katalinic-Jankovic V, Popovic-Grle S, Jankovic M, Mazuranic I, Puljic I, et al. *Mycobacterium xenopi* pulmonary disease-epidemiology and clinical features in non-immunocompromised patients. *J Infect.* 2009;58:108-12.
43. Sánchez-Alarcos JMF, De Miguel-Diez J, Bonilla I, Sicilia JJ, Álvarez-Sala JL. Pulmonary infection due to *Mycobacterium szulgai*. *Respiration.* 2003;70:533-6.
44. Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F. editores. Guía de Terapéutica Antimicrobiana. Barcelona: Antares. Ediciones Escofet Zamora S.L.; 2011.
45. Van Ingen J, Boeree MJ, De Lange WC, De Haas PE, Dekhuijzen PN, Van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium szulgai* in The Netherlands. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1200-5.
46. Rynkiewicz DL, Cage GD, Butler WR, Ampel NM. Clinical and microbiological assessment of *Mycobacterium simiae* isolates from a single laboratory in southern Arizona. *Clin Infect Dis.* 1998;26:625-30.
47. Hana M, Sahly EL, Septimus E, Hanna S, Septimus J, Wallace RJ Jr, et al. *Mycobacterium simiae* pseudo-outbreak resulting from a contaminated hospital water supply in Houston, Texas. *Clin Infect Dis.* 2002;35:802-7.
48. Maoz C, Shitrit D, Samra Z, Peled N, Kaufman L, Kramer MR, et al. Pulmonary *Mycobacterium simiae* infection: comparison with pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27:945-50.
49. Turenne CY, Cook VJ, Burdz TV, Pauls RJ, Thibert L, Wolfe JN, et al. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing scotochromogenic clinical isolate related to *Mycobacterium simiae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1543-51.
50. Emori M, Kajiki A, Ikedo Y, Ochiai S, Iwata Y, Harada Y, et al. 15 cases of pulmonary *Mycobacterium scrofulaceum* infection. *Kekkaku.* 2007;82:173-8.
51. Harro CG, Braden L, Morris AB, Lipkowitz GS, Madden RL. Failure to cure *Mycobacterium gordonae* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Infect Dis.* 1997;24:955-7.
52. Arnow PM, Bakir M, Thompson K, Bova JL. Endemic contamination of clinical specimens by *Mycobacterium gordonae*. *Clin Infect Dis.* 2000;31:472-6.
53. Somoskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, Jonas V, Stasik D, Parsons LM, et al. False-positive results for *Mycobacterium celatum* with the AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* Complex Assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2743-5.
54. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am.* 1959;43:273-90.
55. McGrath EE, Qureshi N. *Mycobacterium chelonae*: friend or foe? *Eur Respir J.* 2007;30:397.
56. Phowthongkum P, Prasanthai V, Udomsantisook N, Suankratay C. Rapidly growing mycobacteria in King Chulalongkorn Memorial Hospital and review of the literature in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2005;88:1153-62.
57. Han XY, Jacobson KL. Rapidly growing mycobacteria: clinical and microbiologic studies of 115 cases. *Am J Clin Pathol.* 2007;128:612-21.
58. Hsieh HC, Lu PL, Chen TC, Chang K, Chen YH. *Mycobacterium chelonae* empyema in an immunocompetent patient. *J Med Microbiol.* 2008;57:664-7.
59. Nomura K, Ogawa M, Miyamoto H, Muratani T, Taniguchi H. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from bronchoscope washing machines. *Am J Infect Control.* 2004;32:185-8.
60. Field SK, Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *CHEST.* 2006;129:1653-72.
61. Álvarez-Uria G. Lung disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med.* 2010;16:251-6.
62. Sánchez-Chardi A, Olivares F, Byrd TF, Julián E, Brambila C, Luquin M. Demonstration of cord factor formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2293-5.
63. Alfa MJ, Manickam K, Sepehri S, Sitter D, Lenton P. Evaluation of Bact/ALERT® 3D automated unit for detection of nontuberculous mycobacteria requiring incubation at 30 °C for optimal growth. *J Clin Microbiol.* 2011; Epub ahead of print.
64. Alcaide F. New methods for mycobacteria identification. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24 Suppl 1:53-7.
65. Leung KL, Yip CW, Cheung WF, Lo ACT, Ko WM, Kam KM. Development of a simple and low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered mycobacteria in a high throughput laboratory. *J Appl Microbiol.* 2009;107:1433-9.
66. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;35:175-8.
67. Leao SC, Bernardelli A, Cataldi A, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods.* 2005;61:193-9.
68. Zhu L, Jiang G, Wang S, Wang C, Li Q, Yu H, et al. Biochip system for rapid and accurate identification of mycobacterial species from isolates and sputum. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3654-60.

69. Park H, Kim C, Park KH, Chang CL. Development and evaluation of triplex PCR for direct detection of mycobacteria in respiratory specimens. *J Appl Microbiol.* 2006;100:161-7.
70. Hsiao CH, Lin YT, Lai CC, Chou CH, Hsueh PR. Identification of nontuberculous mycobacterial infection by IS6110 and hsp65 gene analysis on lung tissues. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2010;68:241-6.
71. Getzlaff SP, Lüthy J, Voit A, Bloemberg GV, Böttger EC. Detection and identification of *Mycobacterium* spp. in clinical specimens by combining the Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with *Mycobacterium* genus detection and nucleic acid sequencing. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3943-8.
72. Syre H, Myneedu VP, Arora VK, Grewal HMS. Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid amplification tests, the Gen-probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and the genotype mycobacteria direct test. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3635-9.
73. Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003. p. 560-87.
74. Richter E, Rüsche-Gerdes S, Hillebrand D. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1769-75.
75. Couto I, Machado D, Viveiros M, Rodrigues L, Amaral L. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1161-4.
76. Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1010-5.
77. Ngan GJY, Ng LM, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP. Development of multiplex PCR assay based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. *Letters in Applied Microbiology.* 2011;52:546-54.
78. CLSI. Susceptibility Testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard- second edition. CLSI document M24-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003. Vol. 23 No. 18. Replaces M24-T2. Vol. 20 No 26.
79. Babady NE, Hall L, Abbenyi AT, Eisberner JJ, Brown-Elliott A, Pratt CJ, et al. Evaluation of *Mycobacterium avium* complex clarithromycin susceptibility testing using SLOMYCO Sensititre panels and JustOne strips. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1749-52.
80. Rodrigues C, Jani J, Shenai S, Thakkar P, Siddiqi S, Mehta A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 system. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:1449-55.
81. Grace SY, Desmond E, Bonato D, Gross W, Siddiqi S. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3630-4.
82. Guna R, Fraile O, Domínguez V, Muñoz C, Garay A, Mallea C, et al. Evaluación del sistema BACTEC MGIT960 para los estudios de sensibilidad de *Mycobacterium kansasii* a isoniazida, estreptomycin, rifampicina y etambutol. X Congreso de la Sociedad Valenciana de Microbiología Clínica. Elche; 2002.
83. Thomson RM, Yew WW. When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Respirology.* 2009;14:12-26.
84. Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, Onyi G, Dunlap R, Ahn CH, et al. Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Clin Infect Dis.* 1994;18:736-43.
85. Adékambi T. *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:911-8.
86. Tortoli E, Rogasi PG, Fantoni E, Beltrami C, De Francisci A, Mariottini A. Infection due to a novel mycobacterium, mimicking multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1130-4.
87. Nash KA, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:170-7.
88. Griffith DE. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23:185-90.
89. Koh WJ, Jeon K, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:405-10.