



Revista Americana de Medicina  
Respiratoria

ISSN: 1852-1630

revista@ramr.org

Asociación Argentina de Medicina  
Respiratoria  
Argentina

Imperiale, Belén; Di Giulio, Beatriz; Moyano, Roberto D.; Santangelo, Ma de la Paz;  
Tártara, Silvina; Alonso, Viviana; Sanjurjo, Myriam; García, Graciela; Castellaro, Patricia;  
Romano, Ma Isabel; Morcillo, Nora  
Relevancia clínica, diversidad y variabilidad genética de distintas especies del género  
Mycobacterium  
Revista Americana de Medicina Respiratoria, vol. 17, núm. 3, septiembre, 2017, pp. 210-  
220  
Asociación Argentina de Medicina Respiratoria  
Córdoba, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382153167004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Relevancia clínica, diversidad y variabilidad genética de distintas especies del género *Mycobacterium*

## Correspondencia

Nora Morcillo  
nora\_morcillo@yahoo.com.ar

Recibido: 28.03.2017

Aceptado: 20.07.2017

**Autores:** Imperiale Belén<sup>1,2</sup>, Di Giulio Beatriz<sup>3</sup>, Moyano Roberto D.<sup>1,2</sup>, Santangelo Ma de la Paz<sup>1,2</sup>, Tártara Silvina<sup>4</sup>, Alonso Viviana<sup>4</sup>, Sanjurjo Myriam<sup>4</sup>, García Graciela<sup>4</sup>, Castellaro Patricia<sup>4</sup>, Romano Ma Isabel<sup>1,2</sup>, Morcillo Nora<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA/CICV), Buenos Aires

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CABA

<sup>3</sup>Hospital Petrona V. de Cordero, San Fernando, Buenos Aires

<sup>4</sup>Hospital Dr. Antonio A. Cetrángolo, Vicente López, Buenos Aires, Argentina

## Resumen

**Introducción:** El término micobacterias no tuberculosas (MNT) incluye distintas especies ambientales capaces de enfermar humanos y/o animales incluso mediante una probable transmisión zoonótica

**Objetivos.** Determinar: la importancia clínica de varias especies del género *Mycobacterium* y la diversidad genética del Complejo *M. avium* (MAC), la sensibilidad bacteriana *in vitro* y el éxito del tratamiento específico.

**Materiales y Métodos:** Recolección de datos clínicos, epidemiológicos y aislamientos en el periodo 2009-2016; identificación molecular de los aislamientos; determinación de la sensibilidad bacteriana *in vitro* y de la diversidad genética del MAC; evaluación del tratamiento.

**Resultados:** Fueron diagnosticados 225 casos de micobacteriosis, con prevalencia estable  $\approx$  6% por año, y 22 especies recuperadas: 4 de rápido desarrollo aisladas de 66 pacientes y 18 de lento desarrollo. MAC fue aislado en 95 casos, 40 *M. avium hominissuis*, 51 *M. intracellulare*, 3 *M. chimaera*, 1 *M. colombiense*. Se observó mayor probabilidad de enfermar por *M. intracellulare* en pacientes tratados previamente por tuberculosis (TB). Los pacientes HIV+ tuvieron riesgo incrementado de enfermedad causada por *M. avium hominissuis*. Los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y macrólidos fueron las drogas más activas frente a la mayoría de las MNT. Aproximadamente la mitad de los casos curaron.

**Conclusiones:** *M. intracellulare*, *M. avium hominissuis* con una gran variabilidad genética, y *M. abscessus* fueron los patógenos más frecuentemente hallados. Un hallazgo importante fue el de casos de enfermedad mixta TB+MNT. Estos pacientes requirieron una terapia con agregado de drogas de segunda línea al esquema terapéutico para TB habiendo curado la mayoría de ellos.

**Palabras clave:** micobacterias no tuberculosas, diversidad e importancia clínica

## Introducción

El término “micobacterias no tuberculosas” (MNT) incluye varias especies capaces de producir un amplio espectro patogénico y ejercer un posible papel zoonótico entre los animales y el hombre. Algunas especies son estrictamente patogénicas mientras que otras pueden causar infecciones

oportunistas como ocurre con los miembros del Complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Sin embargo, la enfermedad causada por las MNT o micobacteriosis se ha incrementado durante las últimas décadas acompañando el aumento en las causas de inmunodepresión como la infección por HIV, las enfermedades malignas y autoinmunes cuyos tratamientos generan las condiciones para

que una infección por MNT pueda evolucionar a enfermedad en los individuos que las padecen<sup>1,2</sup>.

Las micobacterias de rápido desarrollo (MRD) fueron definidas como aquellas especies que requieren menos de 7 días para producir colonias fácilmente observables a simple vista en los medios de cultivo sólidos<sup>3</sup>. Este grupo comprende aproximadamente 56 especies ambientales algunas de ellas que pueden ser aisladas de seres humanos o animales. *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. immunogenum*, *M. peregrinum*, *M. houstonense*, *M. neworleansense* (*M. mageritense*, *M. septicum*, *M. mucogenicum* (previamente organismos *M. chelonae-like*), *M. wolinskyi* y *M. goodii* fueron aisladas de pacientes<sup>4,6</sup>. *M. porcinum*, *M. farcinogenes* y *M. senegalense*, son considerados patógenos de importancia veterinaria aunque *M. porcinum* fue responsable de un brote en humanos relacionado con el suministro de agua potable<sup>7</sup>. *M. abscessus* fue subdividido hace pocos años en tres genoespecies y más recientemente por Tortoli y col. en subespecies del Complejo *M. abscessus*: *M. abscessus subespecie abscessus*, *M. abscessus subespecie masiliense* y *M. abscessus subespecie bolletii*<sup>8-10</sup>. Por razones de simplicidad semántica, algunas de las especies mencionadas son frecuentemente agrupadas e informadas como grupos o complejos: *M. abscessus*, que incluye las especies citadas, y *M. fortuitum-chelonae* que incluye las especies *M. chelonae*, *M. senegalense*, *M. smegmatis* y *M. fortuitum*<sup>7, 10, 11</sup>.

Por otro lado, se denominan “micobacterias de lento desarrollo (MLD) a las especies que requieren más de siete días para evidenciar un crecimiento visible en medios sólidos de cultivo<sup>2,3</sup>. El MAC incluye: *M. avium subespecie selvaticum*, *M. avium subespecie hominissuis*, *M. avium subespecie avium*, *M. avium subespecie paratuberculosis*, *M. intracellulare* y las especies recientemente incorporadas *M. chimaera* y *M. colombiense*<sup>12-14</sup>. *M. avium subespecie hominissuis* y *M. intracellulare* son los patógenos humanos más frecuentes e importantes, mientras que *M. paratuberculosis* (MAP) es un patógeno bovino de gran importancia que causa la Paratuberculosis o enfermedad de *Johne* en los animales. Esta misma micobacteria ha sido postulada como agente patogénico de la enfermedad de Chron en humanos<sup>12,13</sup>.

Estudios de reciente difusión sobre la secuenciación completa de un total de 120 genomas de cepas consideradas como especies

individuales, demostraron que, en algunos casos, se trataría de especies identificadas previamente o bien que estarían en una relación filogenética muy cercana a éstas. Así, han sido incorporados *M. nonchromogenicum* y *M. kumamotoense* al complejo *M. terrae*; *M. chimaera* y *M. colombiense* al MAC; *M. ulcerans* y *M. pseudozhottsi* al complejo *M. marinum*<sup>14,15</sup>.

A diferencia de lo que ocurre con el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis (TB) y dado el hábitat natural de las MNT que incluye el suelo y el agua, el diagnóstico microbiológico de micobacteriosis debe cumplir ciertos requisitos ya establecidos por la Sociedad Americana del Tórax (ATS) que definen si se trata de una eventual colonización o si la micobacteria aislada es la verdadera causante de la enfermedad<sup>15</sup>.

Los objetivos de este estudio fueron: estimar la frecuencia e importancia clínica de las MNT como agentes causantes de enfermedad; determinar la proporción de casos causados por MLD y MRD; explorar la aparición de más de una micobacteria aislada en forma simultánea o no en el mismo huésped; observar las diferencias en la sensibilidad de las distintas especies de MNT a los antibióticos; evaluar el éxito del tratamiento específico; analizar la diversidad genética del MAC, principal causante de micobacteriosis, en el periodo comprendido entre enero 2009 a diciembre 2016.

## Material y Método

Durante el periodo de estudio fue recolectada la siguiente información epidemiológica, demográfica y clínica de los pacientes: edad, género, partido de residencia; localización de la enfermedad de acuerdo con las imágenes obtenidas; infección con el HIV; co-morbilidades que conducen a un estado de inmunodepresión; tratamientos previos para TB o micobacteriosis; número de materiales clínicos analizados con resultados bacteriológicos.

Se recolectaron tanto especímenes clínicos respiratorios, esputos, lavados bronquial y broncoalveolar y aspirados traqueales, como extrapulmonares, fluidos pleural, cefalorraquídeo y abdominal, materia fecal, orina, tejidos, sangre y médula ósea.

Todos los materiales, a excepción de la sangre y la médula ósea que fueron incubados en el sistema Myco-F-Lytic BACTEC 9050 (BD Argentina), fueron procesados para la observación microscó-

pica directa por la coloración de Ziehl-Neelsen y cultivados en medios sólidos (Löwenstein-Jensen y Stonebrink) y en el sistema automatizado BACTEC MGIT 960™<sup>16,17</sup>.

La sensibilidad antimicrobiana fue determinada *in vitro* por medio de un micrométodo colorimétrico (*resazurin micro assay*, REMA), que emplea resazurina como colorante vital y que indica tanto el crecimiento bacteriano como la ausencia de éste<sup>18</sup>. Las drogas incluidas en el antibiograma pueden verse en la Tabla 1.

La identificación de las distintas especies halladas fue realizada por medio del sistema GenoType CM™<sup>19</sup>. Cuando los resultados de la identificación fueron inconclusos, se procedió a secuenciar el gen del ARNr 16S para identificar correctamente los aislamientos<sup>20, 21</sup>.

La diferenciación de los miembros del MAC fue realizada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de la secuencia de inserción 1311 (PCR IS1311) (21). La PCR IS901 fue usada para diferenciar específicamente las subespecies *M. avium* subesp. *avium* (MAA) de *M. avium* subesp. *Hominissuis*<sup>22</sup>.

La diversidad genética del MAC fue explorada por medio de estudio del polimorfismo presente en 8 loci con estructura de VNTR-MIRU, mediante la técnica previamente descrita por *Thibault et al.* 2007 (23). La diversidad alélica (D) de cada locus y el poder discriminatorio global del esquema completo de MIRU-VNTR (HGDI) fueron determinados utilizando el software *online* editado por la Universidad del País Vasco<sup>23-25</sup>

[http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/discriminatory\\_power/](http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/) a través de la siguiente fórmula:

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

Donde N es el número total de aislamientos de cada tipo de esquema; s es el número total de distintos subtipos discriminados por el método de tipificación, y  $x_j$  es el número de aislamientos pertenecientes al subtipo *xth*.

Los patrones hallados fueron comparados con los registrados en la base de datos internacional (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>) de MIRU-VNTR para MAC y asignados a un determinado número de patrón, INMV<sup>22, 26, 27</sup>.

**TABLA 1.** Intervalos de concentraciones de los antibióticos ensayados *in vitro* contra las distintas especies de MNT

Antibióticos	Abreviatura	Concentraciones (µg/mL)	Especies
Ampicilina/ Sulbactam	AMS	0,50-1,00 64,00-128,00	Complejo <i>M. abscessus</i>
Amikacina	AG	0,50-32,00	<i>M. abscessus</i> , MAC,
Kanamicina	KM	0,50-32,00	<i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. kansasii</i>
Amoxicilina	AMC	1,00-128,00	Complejo <i>M. abscessus</i>
Clavulanato de potasio		0,50-16,00	
Azitromicina	AZ	2,00-128,00	MAC, <i>M. fortuitum</i>
Cefoxitina	FOX	0,13-128,00	Complejo <i>M. abscessus</i>
Ceftriaxona	CFX	0,50-512,00	
Cicloserina	CS	3,5-120,0	MAC, <i>M. kansasii</i>
Claritromicina	CLA	0,03-32,00	<i>M. abscessus</i> , MAC
Clofazimina	CFZ	0,03-4,00	MAC, <i>M. kansasii</i>
Etambutol	EMB	1,00-32,00	<i>M. abscessus</i> , MAC, <i>M. chelonae</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. fortuitum</i>
Levofloxacina	FQ	0,0015-16,00	<i>M. abscessus</i> , MAC,
Moxifloxacina		0,06-8,00	<i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. kansasii</i>
Linezolid	LZ	0,06-128,00	<i>M. abscessus</i> , MAC, <i>M. fortuitum</i> , <i>M. kansasii</i>
Imipenem	CAR	1,00-32,00	<i>M. abscessus</i> , MAC
Meropenem		0,06-64,00	
Rifampicina	RIF	0,25-8,00	<i>M. abscessus</i> , MAC, <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. kansasii</i>
Tigeciclina	TIG	0,0015-16,00	<i>M. abscessus</i>
Trimetprima/ sulfametoxazol	TMX	2,50-80,00 0,13-4,00	<i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i>

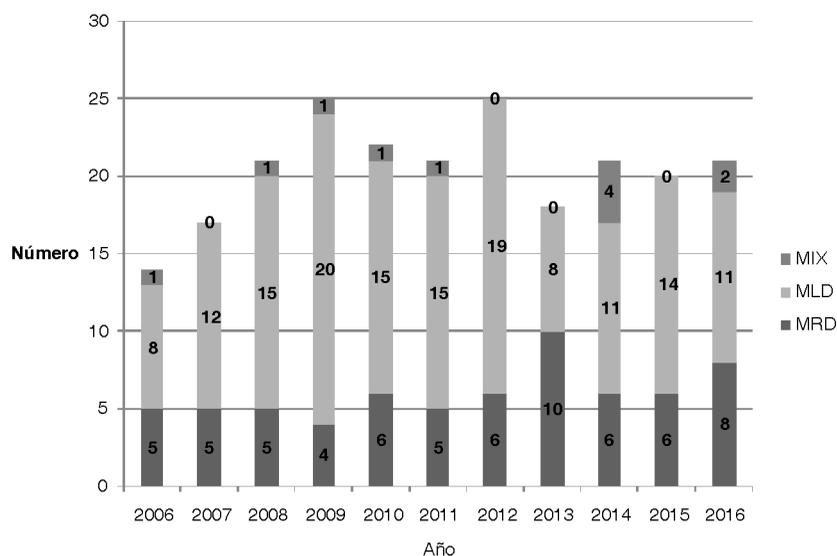
## Resultados

Durante el periodo del estudio el Laboratorio de Micobacterias del Hospital Dr. Antonio A. Cetrán-golo, en su carácter de referente provincial, diagnosticó 4.236 casos de enfermedad micobacteriana de los cuales 3.965 (93,9%) fueron confirmados como casos de TB: un caso causado por el bacilo BCG, tres como *M. bovis* y el resto *M. tuberculosis*. En 271 (6,8%) casos fue aislada una MNT como posible agente causal de la enfermedad. En total fueron excluidos del estudio 46 (1,6%) casos: en 31 fue aislada una MNT por única vez (10 aislamientos pertenecían al complejo *M. gordonae*) que fue desestimada como el agente causal de la enfermedad<sup>27</sup>. En 6 casos no fue posible obtener la identificación apropiada del aislado y en 9 no la información de los pacientes no estaba completa. De los 225 casos restantes, 66 (29,3%) resultaron con MRD, y 159 (70,7%) con MLD. En 15 (6,7%) casos fueron aisladas dos especies de micobacterias diferentes durante el mismo episodio de la enfermedad. La Figura 1 y la Tabla 2 muestran respectivamente la frecuencia de aparición de casos con micobacteriosis causadas por MLD y MRD durante los años del estudio, y la diferenciación en especies y complejos de los aislamientos hallados. En la Tabla 3 se consignan las características de los pacientes incluidos en el estudio. El 71,1% de

los casos tuvo localización pulmonar y de estos el 38,8% presentaba bacilos al examen directo (BAAR +); 8 pacientes (3,6%), de los cuales 6 tenían co-infección con el HIV, presentaron enfermedad diseminada con bacilos aislados de hemocultivos seriados. En 78 (34,7%) pacientes se demostró antecedentes de TB tratada previamente. En 151 (67,1%) casos se presentaban individualmente o en forma simultánea: a) la infección por HIV (43 pacientes); b) una condición física particular (edad avanzada, embarazo); c) alguna co-morbilidad diagnosticada (110 casos, por ejemplo diabetes, bronquiectasias con y sin fibrosis quística, una enfermedad maligna).

Independientemente del sexo del paciente se observó una mayor probabilidad de desarrollar micobacteriosis por *M. intracellulare* en pacientes con tratamiento previo (*odds ratio*: 2,71487, IC 95%: 1,087-6,798;  $X^2$ : 4,398, *p*: 0,0324) mientras que los pacientes con infección por el HIV tuvieron más riesgo de desarrollar enfermedad por *M. avium* subsp. *hominissuis* (*odds ratio*: 7,111, IC 95%: 1,542-33,17;  $X^2$ : 7,930, *p*: 0,0125).

En total fueron recuperadas 22 especies diferentes, de las cuales 4 eran MRD, que fueron aisladas de 66 (29,3%) pacientes: 27 (40,9%) casos con el complejo *M. abscessus*, de los cuales 3 aislamientos pertenecían a la subespecie *M. mageritense* y 2 a *M. bolletii*; y 39 (59,1%) casos con el complejo *M.*



**Figura 1.** Número de los pacientes con MB causadas por SGM y RGM durante los años del estudio

MIX: infección mixta por *M. tuberculosis* y *M. avium* (4 casos), *M. intracellulare* (2 casos), *M. fortuitum* (2 casos), *M. cheoneae* y *M. scrofulaceum* (1 caso cada uno); MRD y MLD: micobacterias de rápido y lento desarrollo.

**TABLA 2.** Características de los pacientes incluidos en el estudio

Característica		Hombres N (%) 126 (56,0%)	Mujeres N (%) 99 (44,0%)	Total N (%) 225 (100)
Edad (años), media, (intervalo) <sup>1</sup> (IC 95%)	44,58 (15-87) (39,79-49,38)	41,73 (1-81) <sup>1</sup> (36,56-46,89)	43,23 (1-87) <sup>1</sup> (39,76-46,69)	
HIV	P	28 (22,2)	15 (15,2)	43 (19,1)
	N	39 (31,0)	38 (38,4)	77 (34,2)
	NI	59 (46,8)	46 (46,4)	105 (46,7)
TTO	Si	49 (38,9)	29 (29,3)	78 (34,7)
	No	64 (50,8)	60 (60,6)	124 (55,1)
	SE	13 (10,3)	10 (10,1)	23 (10,2)
LOC	PUL	92 (73,0)	68 (68,7)	160 (71,1)
	EXP	25 (19,8)	28 (28,3)	53 (23,6)
	PUL+EXP	4 (3,2)	0	4 (1,7)
	DIS	5 (4,0)	3 (3,0)	8 (3,6)
Estado o comorbilidad	≥ 65 años	9 (7,1)	10 (10,1)	21 (9,3)
	Enfermedad maligna	6 (4,8)	10 (10,1)	16 (7,2)
	Diabetes	25 (19,8)	15 (15,2)	40 (17,8)
	Embarazo	-	3 (3,0)	3 (1,3)
	Bronquiectasias	10 (7,9)	6 (6,0)	12 (5,3)
	Fibrosis quística	6 (4,8)	8 (8,1)	18 (8,0)
	No/ND	70 (55,5)	45 (45,5)	115 (51,1)
BAAR	PUL-P	40 (31,7)	22 (22,2)	62 (27,6)
	PUL-N	36 (28,6)	47 (47,5)	83 (36,9)
	EXP-P	2 (1,5,9)	2 (2,0)	4 (1,8)
	EXP-N	21 (16,7)	11 (11,1)	32 (14,2)
	EXP-ND	18 (14,3)	11 (11,1)	29 (12,9)
	Aislamientos	9 (7,1)	6 (6,1)	15 (6,6)

P: positivo; N: negativo; SE: sin especificar; LOC: localización de la enfermedad; BAAR: resultado del examen directo del material; PUL: pulmonar; EXP: extrapulmonar; PUL+EXP: pulmonar mas extrapulmonar; DIS: diseminada; ND: no determinado; TTO: antecedentes de tratamiento previo para tuberculosis o micobacteriosis

*fortuitum-chelonae*: 31 *M. fortuitum* (47,0%), 4 *M. chelonae* y 4 *M. peregrinum*.

Las MLD incluyeron las 18 especies restantes. MAC fue aislado en 95 (42,2%) casos, 40 debidos a *M. avium* subesp. *hominissuis*, y 51 a *M. intracellulare*, 3 casos con *M. Chimaera* y 1 con *M. colombiense*.

En la Tabla 2 se muestra el número y la frecuencia de aparición del total de especies identificadas, los casos atribuidos a una infección mixta y la localización de la enfermedad que produjo los aislamientos de las distintas especies.

De un total de 27 *M. abscessus*, 11 (40,7%) provenían de enfermedad pulmonar, mientras que los 16 restantes fueron obtenidos de lesiones cutáneas y/o heridas provocadas por procedimientos quirúrgicos o cosméticos.

Las cepas de *M. avium* subesp. *hominissuis* tuvieron localización pulmonar, extrapulmonar y diseminada mientras que *M. intracellulare* no causó enfermedad diseminada entre los casos estudiados como si se comprobó, en cambio, en casos con *M. kansasii*. Las especies *M. flavescens*, *M. kubicae*, *M. lentiflavum*, *M. haemophilum*, *M.*

*sherrisi*, *M. branderi*, *M. celatum*, *M. rhodesiae* y *M. xenopi* fueron capaces de producir enfermedad pulmonar, extrapulmonar y diseminada según la procedencia de las muestras desde donde fueron aisladas las bacterias y los datos clínicos de los pacientes.

En un total de 15 casos se hallaron infecciones mixtas: en 11 pacientes se aisló *M. tuberculosis* asociado a otras especies. En 4 casos HIV+ el segundo germen hallado fue *M. avium* subesp. *hominissuis*; en 2 casos HIV+ lo fue *M. intracellulare*, mientras que en pacientes HIV negativos las asociaciones fueron: en 1 caso con *M. abscessus*, en 2 con *M. fortuitum*, en 1 con *M. chelonae* y 1 con *M. kubicae*. Este último fue un paciente añoso internado en una institución para mayores.

En otros 4 casos los hallazgos microbiológicos se produjeron en general durante el tratamiento para el primer germen aislado. Estos 4 casos fueron los siguientes:

a) paciente añoso: en el año 2010 se aisló *M. fortuitum* y en el año 2011, antes de finalizar el tratamiento correspondiente, se aisló *M. intracellulare*

**TABLA 3.** Especies micobacterianas aisladas de distintas localizaciones de la enfermedad

Velocidad	Complejo	Especie (Nº)	Procedencia del aislado	Localización		
MRD (N: 66)	<b><i>M. abscessus</i></b> (n:27)	<i>M. abscessus</i> subesp. <i>boletii</i> (n: 2)	BXT	EXP		
		<i>M. abscessus</i> subesp. <i>masiliense</i> (n: 3)	BXT	EXP		
	<b><i>M. fortuitum-chelonae</i></b> (n: 39)	<i>M. abscessus</i> (n: 22)	E, BXT, BXPIEL	P, EXP		
		<i>M. chelonae</i> (n: 5)	BXT, E	P, EXP		
		<i>M. fortuitum</i> (n: 29)	E, LA, BXT	P, EXP		
		<i>M. peregrinum</i> (n: 5)	E	P		
		<i>M. avium</i> (n: 4)	E, O, BXG	P, EXP		
		<i>M. fortuitum</i> (n: 2)	E, BXT	P, EXP		
	MIX TB (N: 11)	<b><i>M. tuberculosis</i></b>	<i>M. intracellulare</i> (n: 2)	E	P	
			<i>M. scrofulaceum</i> (n: 1)	BXT	EXP	
<b><i>M. avium</i></b>		<i>M. chelonae</i> (n: 1)	E	P		
		<i>M. abscessus</i> (n: 1)	E	P		
		<i>M. intracellulare</i> (n: 1)	E	P		
		<i>M. chelonae</i> (n: 1)	MF, E	EXO, P		
		<i>M. fortuitum</i> + (n: 1)	E	P		
		<i>M. scrofulaceum</i> (n: 1)	HC	DIS		
		<i>M. avium</i> (n: 40)	MF, E, BAL, HC, BXG, BXI	P, EXP, DIS		
		<i>M. chimaera</i> (n: 3)	E	P		
MIX MNT (N: 4)	MAC (n: 95)	<i>M. colombiense</i> (n: 1)	E	P		
		<i>M. intracellulare</i> (n: 51)	E, O, HC	P, EXP, DIS		
		<i>M. nonchromogenicum</i> (n: 1)	E	P		
		<i>M. kumamotoense</i> (n: 2)	BAL	P		
		<i>M. terrae</i> (n: 3)	E	P		
		<i>M. kansasii</i> (n:17)	E, HC	P, DIS		
		<i>M. scrofulaceum</i> (n: 8)	E, BXT	P		
		<i>M. flavescens</i> (n: 5)	E	P		
		<i>M. kubicae</i> (n: 2)	BAL, HC	P, DIS		
		MLD (N: 144)	<b><i>M. terrae</i></b> (n: 6)	<i>M. lentiflavum</i> (n: 3)	HC, BXCER	P, EXP
<i>M. haemophilum</i> (n: 2)	HC			DIS		
<i>M. sherrisi</i> (n: 2)	E, BXG			P, EXP		
<i>M. branderi</i> ;	E, HC			P, DIS		
<i>M. celatum</i> ; <i>M. rhodesiae</i> ;						
<i>M. xenopi</i> (n: 1)						
Otros (N: 43)				<i>M. abscessus</i> (n: 2)	BAL, HC	P, DIS
				<i>M. fortuitum</i> (n: 3)	HC, BXCER	P, EXP
				<i>M. haemophilum</i> (n: 2)	HC	DIS
				<i>M. sherrisi</i> (n: 2)	E, BXG	P, EXP

BAL: lavado bronquioalveolar; E: esputo; HC: hemocultivo; MF: materia fecal; O: orina; BX: biopsias; BXG: de ganglio linfático; BXI: intestino; BXPL: pleural; BXTJ: tejido; BXPIEL: de piel; P: pulmonar; EXP: extrapulmonar; DIS: diseminada

b) paciente HIV+: se aisló *M. avium* subesp. *hominissuis* y durante el tratamiento específico y en el mismo año, *M. intracellulare*

c) paciente HIV+: se aislaron simultáneamente *M. chelonae* y *M. avium* subesp. *hominissuis* en el mismo episodio de enfermedad

d) paciente HIV+: aislamiento en el año 2008 desde esputo de *M. intracellulare*. En el año 2009 y durante el tratamiento por la micobacteriosis se aisló desde hemocultivo, *M. scrofulaceum*

En estos últimos 15 casos las infecciones mixtas se asociaron con los antecedentes de tratamiento previo y/o actual en el grupo masculino (*odds ratio*: 1,5933 (95% IC: 0,6096-3,8217).

La Tabla 4 consigna el número y porcentaje de aislamientos de cada especie, sensibles a cada una de las drogas detalladas en la Tabla 1. EMB

y RIF fueron las únicas drogas de primera línea empleadas en el tratamiento de la TB que fueron incluidas en los antibiogramas de MNT. La RIF fue probada en 165 (75,7%) aislados en total de los cuales 109 (66,0%) resultaron sensibles a la droga. El EMB mostró una actividad inhibitoria global del 84,8% (140/165 aislados) ejercida especialmente sobre *M. kansasii* y algunas cepas del MAC y *M. chelonae*. *M. abscesus*, MAC y *M. kansasii* fueron mayormente susceptibles a CLA; *M. fortuitum* y MAC a la AZ. La CFZ mostró actividad en poco más de un tercio de las cepas del MAC mientras que *M. kansasii* se mostró muy sensible a este antibiótico. Las FQ (levofloxacina y moxifloxacina) ensayadas inhibieron más del 70% de las especies. De los antibióticos beta-lactámicos, AMS, AMC y FOX, sólo éste último fue activo frente al complejo

**TABLA 4.** Número y porcentaje de especies de MNT que fueron inhibidas por los antimicrobianos

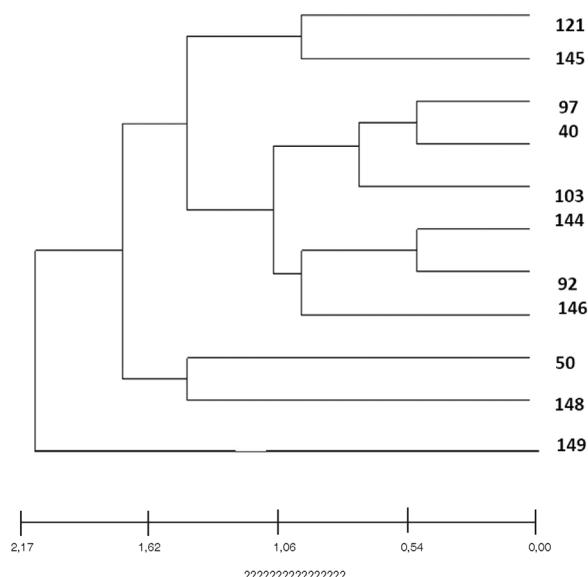
Droga	Número total y porcentaje (%) de aislamientos sensibles según la especie					
	Mab (n: 27)	MAH (n:37)	Mint (n: 51)	Mche (n: 5)	Mfor (n: 28)	Mkan (n: 17)
AG	27 (100)	29 (78,4)	31 (60,8)	3/5	15 (53,6)	17/17
AZ	ND	34 (92,0)	50 (98,0)	ND	23 (82,1)	ND
AMS/C	2 (7,4)	ND	ND	ND	ND	ND
CAR	11 (36,7)	38 (43,2)	ND	ND	ND	ND
FOX	15 (56,0)	16 (43,2)	ND	ND	ND	ND
CS	ND	15 (40,5)	31 (60,8)	3/5	ND	13/17
CLA	24 (80,0)	33 (89,2)	46 (90,2)	ND	ND	ND
CFZ	ND	50 (35,1)	0	0	ND	15/17
EMB	17 (62,9)	26 (70,3)	36 (71,4)	4/5	6 (21,4)	15/17
ETH	ND	18 (48,6)	13 (25,0)	ND	ND	4/17
FQ	21 (70,0)	32 (86,5)	34 (66,6)	3/5	25 (89,3)	16/17
LZ	11 (40,7)	21 (56,7)	47 (92,1)	ND	11 (39,3)	11/17
RBT	10 (37,0)	27 (72,9)	42 (82,4)	4/5	6 (21,4)	16/17
RIF	19 (70,4)	26 (70,3)	39 (76,5)	1/5	10 (35,7)	14/17
TG	17 (62,9)	ND	ND	ND	ND	ND
TMS	21 (77,8)	ND	ND	ND	57 (92,8)	ND

Mab: *Mycobacterium abscessus*; MAH: *M. avium* hominissuis; Mint: *M. intracellulare*; Mfor: *M. fortuitum*; Mkan: *M. kansasii*. AG: aminoglicósidos (kanamicina, ampicacina); AZ: azitromicina; AMS/C: ampicilina-sulbactam/amoxicilina-clavulanato de potasio; CAR: carbapenemes (imipenem, meropenem); CS: cicloserina; CLA: claritromicina; CFZ: clofazimina; EMB: etambutol; ETH: etionamida; FOX: cefoxitina; FQ: fluoroquinolonas (levofloxacina, moxifloxacina); LZ: linezolid; RBT: rifabutina; RIF: rifampicina; TG: tigeciclina; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol; ND: no determinado

*M. abscessus*. Dos tercios de estas cepas fueron inhibidas por AG, FOX, CLA, FQ, RIF y TMS mientras que un porcentaje menor (alrededor del 60%) también lo fue por EMB y TG. La mayoría de las cepas del MAC fue inhibida por AG, AZ, CLA, EMB, FQ, RIF y RBT. La actividad del LZ fue mayor sobre los aislados de *M. intracellulare* que sobre los de *M. avium*.

El 80% de los MAH (n: 32) fue correctamente genotipificado, exhibiendo una gran diversidad genética. Por la técnica MIRU-VNTR fueron hallados 5 patrones conocidos y otros 6 patrones recientemente publicados por nuestro grupo y no reportados previamente en la literatura<sup>28</sup>. Los loci X3 y 292 mostraron el mayor índice de discriminación (D) entre los aislamientos de MAH (0.7424 y 0.6515), obteniéndose un altoHGDI (0,9697).

En las Figuras 2 y 3 pueden observarse los patrones (INMV) genéticos de MAH encontrados y la relación filogenética existente entre los mismos. Las relaciones entre los diversos patrones INMV son mostradas en un dendrograma de la Figura 2. Las Figuras 3 y 4 muestran las relaciones clonales entre los distintos patrones, representadas por el *Minimum Spanning Tree* (MST) construido a partir del algoritmo de *goeBURST*. Se asume generalmente que la distancia genética entre dos patrones de INMVes proporcional a la diferencia del número de repeticiones de cada locus. Estas relaciones fueron establecidas uti-

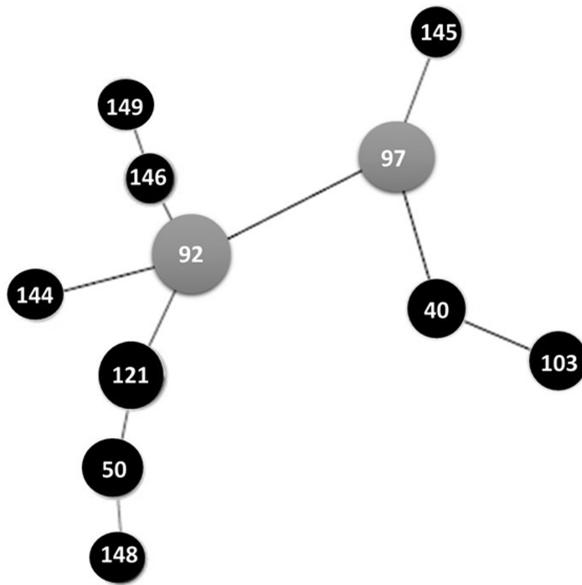


**Figura 2.** Dendrograma con los patrones genéticos de *M. avium* hominissuis hallados

Los números 121 a 149 corresponden a los distintos patrones genéticos (INMV) según la base de datos INMV-MAC. El dendrograma muestra la distancia que existe entre los distintos patrones encontrados, siendo 2,17 el valor para los aislamientos que se encuentran más alejados genéticamente.

lizando el Software *PhyloViz 2* (<http://goeburst.phyloViz.net>)<sup>26</sup>.

Con respecto al éxito del tratamiento específico, fueron evaluados un total de 109 (63,7%) de los 171 (76,0%) pacientes que lo comenzaron en el periodo



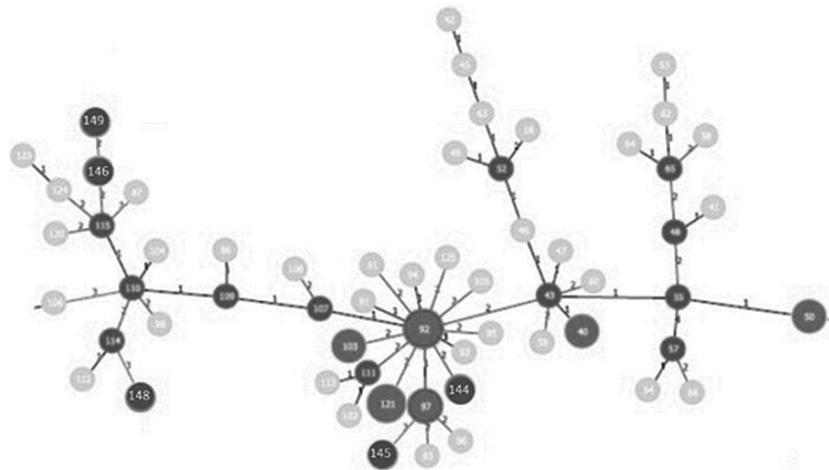
**Figura 3.** “Minimum spanning tree” con los patrones genéticos de *M. avium hominissuis* hallados en el estudio. EL *Minimum Spanning Tree* representa la relación clonal entre los distintos patrones genéticos (INMV). Los números representan los diferentes patrones de INMV encontrados para MAH. En gris se encuentran los clones que dieron origen al resto de los patrones de MAH. El tamaño de los círculos se relaciona con el número de aislamientos de cada patrón.

2009-2014. En 71 (65,1%) casos la cohorte consignaba “tratamiento terminado o curado” (TT/C). El abandono de la terapia y los fallecimientos ascendieron a 12,8%, con 8 y 6 pacientes respectivamente, se produjeron 6 (5,5%) recaídas y 16 casos (14,7%) figuraban en continuación del tratamiento al momento de la evaluación. De los 62 (36,3%) pacientes restantes no se obtuvo información.

De los 54 (24,0%) pacientes que iniciaron tratamiento en los años 2015 y 2016 fue posible evaluar el éxito en 41 (76,0%), de los cuales 3 (7,3%) murieron, 4 (9,8%) fueron registrados como TT/C y 34 (83,0%) continuaban en tratamiento a la fecha del relevamiento. De los 11 casos con infección mixta, 7 fueron notificados como TT/C. El éxito global del tratamiento fue estimado en 50,0 % según la relación entre el número de casos evaluados en el período 2009-2015 (n: 150) y los TT/C (n: 75).

**Conclusiones**

Las MNT son organismos ubicuos, naturalmente de vida libre, consideradas agentes infecciosos oportunistas especialmente en huéspedes con alteracio-



**Figura 4.** “Minimum spanning tree” con los patrones de *M. avium hominissuis* hallados y los que figuran reportados en la base de datos INMV-MAC. Los números representan los diferentes patrones de INMV. En gris oscuro se representan los INMV encontrados en el estudio, mientras que en gris claro están los patrones de MAH que están reportados en la base de datos y que no fueron encontrados entre los aislamientos estudiados. El tamaño de los círculos se relaciona con el número de aislamientos de cada patrón. En este estudio se muestra al INMV 92 como el principal clon que dio origen al resto de los aislamientos. Los números que se encuentran entre cada línea que une los distintos clones representan la distancia genética entre dos patrones, proporcional a la diferencia del número de repeticiones de cada *locus*.

nes de la inmunidad celular en los que producen una enfermedad semejante a la TB, denominada genéricamente micobacteriosis<sup>28</sup>.

La incidencia de MNT fue de alrededor del 6,0% de todos los casos inicialmente considerados como TB con una tendencia más o menos estable durante el periodo considerado. Estos resultados comparados con los publicados previamente, muestran una tendencia estable en el tiempo de la aparición de MB en nuestro medio<sup>20</sup>.

En este estudio los pacientes presentaron mayoritariamente lesiones con localización respiratoria si bien la enfermedad pudo ser también extrapulmonar, mixta o diseminada; más de un tercio habían recibido tratamiento previo para TB y casi la mitad presentaba co-morbilidades como patología de base concordando este dato con lo publicado previamente<sup>29-31</sup>. Sin embargo, la TB previa fue el factor de riesgo más importante para las micobacteriosis causadas especialmente por *M. intracellulare* que junto con *M. avium* subesp. *hominissuis* fueron los patógenos más frecuentemente hallados.

En total fueron recuperadas 22 especies de MNT diferentes con predominio de las MLD.

Las MRD y, particularmente, los miembros del complejo *M. abscessus*, son considerados patógenos oportunistas emergentes que pueden causar infecciones pulmonares crónicas y afecciones en la piel, tejidos blandos, huesos y articulaciones. Existen numerosas publicaciones donde estas MRD están involucradas en infecciones asociadas a heridas traumáticas, cirugías y procedimientos diversos: acupuntura, liposucción, mesoterapia, implantación de prótesis mamarias<sup>29-31</sup>.

En este estudio el número de casos con localización pulmonar de la enfermedad causada por el complejo *M. abscessus*, aislado de tejidos y esputos, fue similar al de los casos no respiratorios. *M. nonchromogenicum* y *M. peregrinum* fueron también encontrados aunque con baja frecuencia y localización exclusivamente pulmonar.

Entre las MRD, las especies de los complejos *M. abscessus* y *M. fortuitum*-*M. chelonae* fueron las más frecuentemente aisladas, estas últimas preponderantemente de afecciones pleuro-pulmonares.

Dentro del MAC los patógenos más frecuentemente hallados fueron *M. intracellulare* y *M. avium* subesp. *hominissuis* aunque también fueron aislados *M. chimaera* y *M. colombiense*. Los

miembros del MAC junto a *M. kubicae* y *M. haemophilum* fueron causantes de enfermedad diseminada. *M. avium* subesp. *hominissuis* presentó gran variabilidad genética, hecho que sugiere diversidad de fuentes de infección. Además, la TB previa fue el factor de riesgo más importante especialmente para la enfermedad por *M. intracellulare*.

Otras especies de MLD como *M. kumamotoense* y *M. rhodesiae* fueron también halladas aunque en baja proporción.

Algunas MNT, como los miembros del MAC, pueden infectar no solamente aves sino también a mamíferos como el cerdo. Recientemente ha sido publicado un estudio efectuado en Bélgica donde más del 98% de los aislamientos de cerdos correspondieron a *M. avium* subesp. *hominissuis* hallazgo podría sugerir una transmisión zoonótica de estas micobacterias<sup>25</sup>. Este último punto hace pensar en la necesidad de planificar estudios de tipo genético y epidemiológico que permitieran corroborar o bien descartar la potencial zoonosis en las micobacteriosis y, asimismo, evaluar una posible transmisión directa entre huéspedes.

Si bien los resultados de los antibiogramas efectuados sobre las MNT tienen un carácter informativo y deben ser tomados con precaución por parte de los médicos tratantes, los resultados de este estudio mostraron concordancia con lo publicado previamente por varios autores<sup>31-33</sup>. En general los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y los macrólidos fueron las drogas ensayadas más activas frente a la mayor variedad de MNT, si bien ninguna especie se mostró homogéneamente sensible a ellas. Las demás drogas mostraron una relación especie dependiente más manifiesta. En este sentido la identificación del germen a nivel de especie es importante como predictor de la sensibilidad a los fármacos y una guía para el médico en la implementación de una terapia adecuada. Recientemente ha sido publicada una revisión sobre nuevos antimicrobianos con actividad frente a las MNT en varios estadios de desarrollo<sup>32</sup>. En este estudio, la evaluación de las cohortes demostró que alrededor de la mitad de los casos con micobacteriosis curaron si bien se registró una importante pérdida de la información y las cohortes resultaron muy incompletas.

Un hecho remarcable fue el hallazgo simultáneo de *M. tuberculosis* causando enfermedad conjuntamente con una MNT. La recuperación simultánea de *M. tuberculosis* junto a una MNT fue interpre-

tado como una causa conjunta de enfermedad. Los casos fueron tratados con esquemas normatizados para TB empleando en la fase inicial isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, drogas a las cuales los *M. tuberculosis* aislados eran originalmente sensibles. El tratamiento convencional continuó hasta que la detección de las MNT y/o la falla del tratamiento (mantenimiento de baciloscopías y cultivos positivos) llevaron a personalizar los esquemas terapéuticos agregando al convencional aminoglucósidos, fluoroquinolonas y alguna otra droga de acuerdo con la especie de MNT identificada (Tártara comunicación personal), los esquemas recomendados y los resultados de sensibilidad *in vitro* obtenidos para el aislamiento<sup>33</sup>. La mayoría de estos casos se curaron.

Con respecto a la variabilidad de los aislamientos de *M. avium* subesp. *hominissuis* obtenidos, la técnica molecular utilizada permitió demostrar la existencia de una alta diversidad genética entre los aislamientos. Además, los patrones de INMV obtenidos en este estudio pudieron ser comparados y analizados con los reportados por otros autores en la base de datos internacional (MAC-INMV)<sup>24</sup>. La elaboración del MST permitió establecer relaciones clonales entre los distintos aislamientos. El INMV 92 resultó ser clon originario tanto cuando el MST incluyó sólo a los aislamientos del estudio, como a los reportados mundialmente en la base de datos. Hecho que confirma su rol como clon a partir del cual derivan otros aislamientos de *M. avium* subesp. *hominissuis*.

**Agradecimientos.** A Marcelo Mazza, Guillermo Alonso, Bibiana Zingoni y Claudia Palavecino por su excelente trabajo técnico.

**Conflicto de interés:** Los autores del trabajo declaran no tener conflictos de intereses relacionados con esta publicación.

BRI, MPS y MIR son investigadores de CONICET; DM es becario postdoctoral de CONICET.

## Bibliografía

- Nunes-Costa D, Alarico S, Pretti Dalcolmo M, Correia-Neves M, Empadinhas N. The looming tide of nontuberculous mycobacterial infections in Portugal and Brazil. *Tuberculosis* 2016; 96: 107-119.
- Stahl, DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol* 1990; 172: 116-124.
- Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *ClinMicrobiolRev* 2014; 27: 727e52. En: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00035-14>.
- Brown-Elliott BA, Griffith De, Wallace RJ. New described emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin N Am* 2002; 16:187-220.
- Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 884-901.
- Tsang AY, Barr VL, McClatchy JK, Goldberg M, Drupa I, Brennan PJ. Antigenic relationships of the *Mycobacterium fortuitum*- *M. chelonae* complex. *Int J Syst Bacteriol* 1984. 34: 35-44.
- Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr., Tichindelean Cet al. Five-Year Outbreak of Community and Hospital-Acquired *Mycobacterium porcinum* Infections Related to Public Water Supplies. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 4231-4238.
- Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics* 2014; 15:359 En: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/359>.
- Tortoli E, Kohl TA, Brown-Elliott BA et al. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016; 66: 4471-4479.
- Tan JL, Ngeow YF, Choo SW. Support from Phylogenomic Networks and Subspecies Signatures for Separation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3042-3046.
- Brown-Elliott B A, Wallace RJ. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15: 716-746.
- Narnaware SD, Periasamy S, Tripathi BN. Studies on pathology, cytokine gene expression and molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of naturally occurring Johne's disease in bullocks. *Res Vet Sci*. 2016; 106:74-80.
- Kan P, Pilli AS, Rampal R et al. Prevalence and Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with disease course in patients with ulcero-constrictive ileocolonic disease. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0152063. doi: 10.1371/journal.pone.0152063.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Cattanzaro A, Daley C, Gordon F. An official ATS/IDSA statement diagnosis, treatment and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.
- American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:S1-S25.
- Tortoli E. The impact of whole genome sequencing on the taxonomy of mycobacteria. *European Society of Mycobacteria, 37<sup>th</sup> Annual Congress, 3<sup>rd</sup> to 6<sup>th</sup> July 2016, Catania, Sicily, Italia. Scientific Program and Abstracts Book*, pp: 29.
- Becton Dickinson. BBL MGIT Products for the Detection of Mycobacteria. Becton Dickinson Cockeysville, Maryland, USA. Insert 88-0950, 1996.
- Jacomo V, Musso D, Gevaudan MJ. Isolation of blood-borne *Mycobacterium avium* by using the nonradiative BACTEC 9000 MB system and comparison with a solid-culture system. *J ClinMicrobiol*. 1998; 3703-3706.
- Martin A, Paasch F, Docx S, et al. Multicentre laboratory

- validation of the colorimetric redox indicator (CRI) assay for the rapid detection of extensively drug-resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 827-833.
20. Richter E, Rüscher-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1769-1775.
  21. Imperiale B, Zumárraga M, Gioffré A, Di Giulio B, Cataldi A, Morcillo N. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Rev Argent Microbiol* 2012; 44:3-9.
  22. Travería G, Zumárraga M, Etchechoury I et al. First identification of *Mycobacterium avium paratuberculosis* sheep strain in Argentina. *Brazilian J Microbiology* 2013; 44: 897-899.
  23. Thibault VC, Grayon M, Boschirola ML et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2404-2410.
  24. Imperiale B, Moyano RD, Di Giulio AB et al. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* complex strains isolated in Argentina by MIRU-VNTR. *Epidemiology and Infection*, Cambridge University Press 2017, pp: 1-10 doi: 10.1017/S0950268817000139.
  25. Vluggen C, Soetaert K, Duytschaever L et al. Genotyping and strain distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from humans and pigs in Belgium, 2011-2013. *Euro Surveill*. 2016; 21: 30111. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.3.30111.
  26. Hunter P. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1903-1905.
  27. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2465-2466.
  28. Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carric JA. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* 2012, 13:87. DOI: 10.1186/1471-2105-13-87.
  29. Wassilew N, Hoffmann H, Andrejak C, Lange C. Pulmonary Disease Caused by Non-Tuberculous Mycobacteria. *Respiration* 2016;91:386-402. DOI: 10.1159/000445906.
  30. Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A et al. Infecciones en tejido blando debidas a micobacterias no tuberculosas posterior a mesoterapia. ¿Cuál es el precio de la belleza? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24: 302-306.
  31. Da Mata O, Hernández-Pérez R, Corrales H, Cardoso-Leao S, de Waard J. Seguimiento de un brote de infección en tejido blando causado por *Mycobacterium abscessus* posterior a la mesoterapia en Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:596-601.
  32. I. Porvaznik, I. Solovic´ J, Mokry J. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. *Adv Exp. Medicine, Biology, Neuroscience and Respiration* 2016. DOI 10.1007/5584\_2016\_45.
  33. Soni I, De Groote MA, Dasgupta A, Chopra S. Challenges facing the drug discovery pipeline for non-tuberculous mycobacteria. *J Medical Microbiol* 2016; 65: 1-8.
  34. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ Jr. Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. *CMR J Association for Microbiology* 2012; 25: 545-582.