

**Micobacterias no tuberculosas: actual importancia clínica
y principales factores de virulencia**

Raúl Garza-Velasco¹, Fabiola Monroy-Zamorate¹ y Luis Manuel Perea-Mejía²

¹Facultad de Química, UNAM

²Facultad de Medicina, UNAM

RESUMEN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) incluyen a un importante grupo de agentes etiológicos de diversos padecimientos en humanos, dentro del cual destacan por su frecuencia y virulencia el complejo MAC (*Mycobacterium avium complex*), así como las especies *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*.

Las patologías causadas por estos microorganismos han venido creciendo en cuanto a incidencia en las últimas décadas y afectan principalmente a los individuos inmunocomprometidos, involucrando a distintos órganos y tejidos, aunque los cuadros patológicos más comunes son la enfermedad pulmonar, las infecciones diseminadas, pulmonares, linfadenitis e infecciones de piel y tejidos suaves.

Los factores de virulencia de las MNT incluyen componentes de la envoltura celular, enzimas y otras moléculas que actúan como moduladores de la respuesta inmune. Lógicamente, su función global consiste en favorecer la colonización y supervivencia micobacteriana en diversos tejidos del hospedero.

El presente trabajo describe las principales patologías debidas a estas bacterias y los factores de virulencia que sustentan su prolongada permanencia en el paciente.

Terminología clave: Micobacterias no tuberculosas; micobacteriosis; individuos inmunocomprometidos; factores de virulencia; supervivencia micobacteriana en los tejidos del hospedero.

Nontuberculous mycobacteria: clinical importance and virulence factors

Nontuberculous mycobacteria represent an important group of etiological agents of human diseases. The most common pathogens in this group are *Mycobacterium avium complex*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum*.

A variety of diseases are produced by these organisms with increased frequency in the last decades. They affect to immunocompromised individuals involving different tissues, but the most important pathologies are pulmonary disease, disseminated infections, lymphadenitis, and skin and soft tissue infections.

Several virulence factors of nontuberculous mycobacteria are located in the cell wall but also participate some enzymes and other molecules that act as modulators of the immune response. Logically its global function consists on promoting colonization and surviving of mycobacteria in host tissues.

The present work describes the more relevant diseases caused by these bacteria and its main virulence factors.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria; mycobacterioses; immunocompromised individuals; surviving in host tissues.

INTRODUCCIÓN

La cantidad de miembros del género *Mycobacterium* ha estado en permanente aumento, reconociéndose en la actualidad a alrededor de 115 especies, la mayor parte de las cuales no causa enfermedad al humano. Evidentemente, entre las virulentas destacan *Mycobacterium leprae* y las que constituyen al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, pero existen muchas otras que figuran como oportunistas o como patógenas consistentes, a las que se ha agrupado bajo la denominación de micobacterias atípicas, micobacterias no tuberculosas (MNT) o MOTT (*mycobacteria other than tubercle bacilli*).

Sin lugar a dudas, las MNT han venido adquiriendo más relevancia en el campo de la salud pública, debido principalmente al incremento de su frecuencia como agentes causales de severas patologías que afectan pulmones, glándulas linfoides, piel, heridas, huesos, etc., particularmente en las personas debilitadas e inmunocomprometidas, incluidas las que padecen de SIDA. Consecuentemente, el interés de la comunidad científica por estos microorganismos ha crecido en forma radical en los tiempos recientes, lo que ha permitido conocer los diversos aspectos asociados a las patologías que ocasionan y a sus factores de virulencia.

Finalmente, debe subrayarse que el tratamiento de las micobacteriosis se ha complicado notablemente, habida cuenta que estos microorganismos han desarrollado resistencia hacia un amplio número de antibióticos. En tal contexto, las investigaciones actuales también incluyen la búsqueda de nuevos agentes antimicobacterianos y de nuevos sitios “blanco” para los fármacos tradicionales y los que aún están en estudio.

El presente trabajo aborda las principales temáticas acerca de las enfermedades y los factores de virulencia de las MNT, por tratarse de aspectos centrales de las medidas profilácticas, diagnósticas y terapéuticas que se requieren en la actualidad.

PATOLOGÍA

El género *Mycobacterium* incluye a más de 100 especies, sólo una parte de las cuales son consideradas como patógenas. Las infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas (MNT) representan entre el 0.5 y el 30% del total de las enfermedades en humanos ocasionadas por micobacterias, destacando la participación etiológica de las siguientes especies (1, 2, 3):

- *MAC*¹
- *M. abscessus*
- *M. asiaticum*
- *M. bohemicum*
- *M. branderi*
- *M. celatum*
- *M. chelonae*
- *M. conspicuum*
- *M. elephantis*
- *M. flavescens*
- *M. fortuitum*
- *M. genavense*
- *M. goodii*
- *M. gordonae*
- *M. habana*
- *M. haemophilum*
- *M. heckeshornense*
- *M. heidelbergense*
- *M. immunogenum*
- *M. interjectum*
- *M. kansasii*
- *M. lentiflavum*
- *M. Malmöense*
- *M. marinum*
- *M. mucogenicum*
- *M. neoaurum*
- *M. nonchromogenicum*
- *M. palustre*
- *M. paratuberculosis*
- *M. peregrinum*
- *M. scrofulaceum*
- *M. septicum*
- *M. shimoidi*
- *M. simiae*
- *M. smegmatis*
- *M. szulgai*
- *M. terreae*
- *M. thermoresistibile*
- *M. triplex*
- *M. ulcerans*
- *M. vaccae*
- *M. wolinskyi*
- *M. xenopi*

Las MNT han sido reconocidas como agentes etiológicos de infecciones pulmonares y extrapulmonares, implicando en este último caso a glándulas linfoides, piel, huesos, tejidos blandos o heridas; comúnmente, sus patologías presentan diversas sintomatologías y se

¹ Complejo *Mycobacterium avium*; incluye a *M. intracellulare* y *M. avium*

pueden manifestar como localizadas o diseminadas, dependiendo de la predisposición y de las condiciones del sistema inmunológico del paciente. Evidentemente, existe una notable variabilidad geográfica en cuanto a la prevalencia de las especies responsables aunque, en general, se acepta que la incidencia de los padecimientos debidos a especies del complejo *M. tuberculosis* ha venido disminuyendo, en la medida en la que han aumentado las ocasionadas por MNT (3, 4).

Por otra parte, es realmente poco lo que se ha logrado establecer respecto a las formas de contagio, si bien se piensa que las micobacteriosis no son transmitidas de persona a persona, sino por ingestión de alimentos contaminados, inhalación de aerosoles o situaciones iatrogénicas (3).

El incremento en la frecuencia de las enfermedades provocadas por MNT tiene actualmente su fundamento en la mayor virulencia de las micobacterias y en el crecimiento del número de individuos inmunocomprometidos -como aquellos que padecen SIDA-; sin embargo, también debe tomarse en cuenta que ahora se dispone de técnicas más específicas y sensibles para identificar a estos microorganismos, los cuales anteriormente pasaban inadvertidos en las muestras clínicas (3, 4).

Entre los padecimientos causados por MNT figuran la neumonía, linfadenitis cervical, infecciones diseminadas asociadas a deficiencia inmunitaria de tipo celular, enfermedad de Crohn y, con menor frecuencia, las infecciones de la piel, osteomielitis, otitis media e infecciones en heridas y en las incisiones por donde se insertaron catéteres (1, 3).

Las manifestaciones clínicas implicadas dependen del órgano afectado, aunque suelen presentarse síntomas inespecíficos tales como fiebre persistente, sudores nocturnos, anemia, pérdida de peso, anorexia, diarrea, mialgia y adenopatía (3).

Las infecciones debidas a MNT se relacionan a tasas importantes de morbilidad y mortalidad en individuos con inmunidad local o sistémica alterada, tal como la que caracteriza a los pacientes con SIDA o a quienes se les administran agentes inmunosupresores por haber sido sometidos a transplantes. Otros factores de riesgo incluyen diversas enfermedades pulmonares y esofágicas, gastrectomía, alcoholismo crónico, incisiones quirúrgicas, inyecciones y heridas punzantes (3, 5, 6).

Infecciones pulmonares. El órgano más comúnmente afectado por las MNT es el pulmón y las manifestaciones clínicas involucradas son similares a las observadas en los casos de tuberculosis. Los criterios de diagnóstico se han estandarizado a través de las guías publicadas por la Sociedad Torácica Americana (ATS) e incluyen pruebas radiológicas, clínicas y microbiológicas (7, 8, 9).

Los signos y síntomas más frecuentes son fiebre, sudores nocturnos, tos crónica, secreción de esputo, disnea progresiva, pérdida de peso, fatiga, hemoptisis y dolor en el pecho; la evaluación del paciente suele dificultarse debido a enfermedades pulmonares co-existentes tales como la enfermedad obstructiva crónica, bronquiectasia, fibrosis quística, escoliosis torácica, neumoconiosis (asbestosis y silicosis), pulmón negro, proteinosis alveolar, bronquitis crónica y enfisema (7, 8, 9).

La enfermedad pulmonar predomina en pacientes masculinos que fuman y presentan enfisema, aunque también se ha reportado en mujeres de edad avanzada que no fuman ni presentan alguno de los factores de riesgo. Las cepas del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y *M. kansasii* han sido identificadas frecuentemente como agentes causales de esta patología; se les considera patógenos oportunistas distribuidos ampliamente en el medio ambiente (suelo y agua), los cuales pueden infectar a diversas especies, incluyendo aves, cerdos y humanos, provocándoles infecciones asintomáticas o sintomáticas que pueden resultar mortales (3, 5).

El resto de las especies de MNT reportadas como patógenas, abarca a *M. abscessus*, *M. asiaticum*, *M. branderi*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. elephantis*, *M. fortuitum*, *M. habana*, *M. haemophilum*, *M. heckeshornense*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. vaccae* y *M. xenopi*. *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* se aíslan con mayor frecuencia de muestras provenientes de enfermos con fibrosis quística; *M. heckeshornense* destaca por causar múltiples cavidades en el pulmón; *M. scrofulaceum* se asocia a infecciones pulmonares localizadas y *M. xenopi* se ha encontrado en pacientes con otras enfermedades subyacentes del pulmón (3, 10, 11).

Otra interesante enfermedad pulmonar es la neumonitis por hipersensibilidad, la cual implica a pacientes inmunocompetentes que se han expuesto a aerosoles con micobacterias; la enfermedad se asocia principalmente a tinas calientes y albercas, por lo que las personas afectadas más comúnmente son las que frecuentan el uso de estas fuentes acuáticas.

Adenitis. La forma más conocida de adenitis debida a MNT es la linfadenitis cervical e implica a niños menores de cinco años que presentan una cierta predisposición, denominada

susceptibilidad mendeliana, a las enfermedades provocadas por micobacterias. La anomalía parece residir en alguna mutación en los genes *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B* o *IL12RB1*, lo que altera la inmunidad mediada por el interferón gamma (IFN- γ) (2, 12).

La primera especie aislada como agente causal de linfadenitis cervical fue *M. scrofulaceum*, si bien con el tiempo se ha reconocido a *M. abscessus*, *M. bohemicum*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. elephantis*, *M. fortuitum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. malmoense*, *M. palustre*, *M. triplex* y *M. xenopi*. Actualmente, el MAC es la principal causa de la afección a nivel mundial; de hecho, en fechas recientes, su incidencia ha aumentado en los Estados Unidos. En cuanto a otras especies, existen diferencias en cuanto a su distribución geográfica; por ejemplo, mientras en Europa la segunda especie en importancia es *M. malmoense*, en los Estados Unidos ese lugar es ocupado por *M. scrofulaceum* (2, 12).

Generalmente, la enfermedad es precedida por una infección del tracto respiratorio superior, afecta a los nódulos linfáticos cervicales: submandibular, submaxilar o periauricular y se manifiesta como un absceso sólido unilateral, que en la mayoría de los casos no es doloroso al tacto. La piel puede evidenciar una decoloración púrpura y, en algunos casos, la formación de una fístula; la inflamación permanece durante semanas o meses, el uso de antibióticos no produce mejoría y un ultrasonido puede mostrar pequeñas calcificaciones que sugieren enfermedad por micobacterias. Para efectuar un diagnóstico certero se debe descartar que haya historia de exposición a tuberculosis (12).

Enfermedad de Crohn. Los avances en las técnicas de identificación han permitido reconocer a *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, microorganismo también

conocido como *M. paratuberculosis*, que funge como el principal agente etiológico de la enfermedad de Crohn. La participación de esta micobacteria también se ha confirmado poniendo en evidencia anticuerpos séricos contra los antígenos p35 y p36 de *M. paratuberculosis* en numerosos pacientes (1).

La enfermedad presenta como factores desencadenantes una susceptibilidad genética, desbalance inmunológico e infecciones y dieta, si bien se ha demostrado que ninguno de los anteriores origina la enfermedad actuando de manera independiente. Los datos obtenidos mediante cultivos y técnicas de hibridación *in situ* han permitido estimar que la proporción de pacientes infectados con *M. paratuberculosis* fluctúa entre 35 y 40%; el agente causal provoca una respuesta inflamatoria crónica mediada por linfocitos TH1 y la destrucción del tejido se traduce en ulceraciones y fistulas intestinales, acompañadas por fiebre, diarrea y dolor en la parte inferior derecha del abdomen; el cuadro afecta predominantemente al intestino delgado, en especial a la válvula íleo-cecal, pero también se extiende al estómago, duodeno e intestino grueso, provocando estrechez del colon y, por lo tanto, estreñimiento y dilatación gástrica (1).

Enfermedad diseminada. Si bien casi todas las MNT pueden causar infecciones diseminadas, el agente etiológico más frecuente es el MAC y a éste le sigue *M. kansasii*. La patología se presenta más comúnmente en pacientes con inmunodeficiencias familiares (en especial los asociados a defectos en los receptores de IFN- γ); los enfermos de linfoma y leucemia; los que se encuentran bajo terapia con esteroides; quienes padecen enfermedad vascular del colágeno; y los que han recibido transplantes de médula ósea o algún órgano. Las MNT originan el 0.8 a 6% de las infecciones posteriores al trasplante renal y su frecuencia es aún menor después de transplantes de corazón (12).

La enfermedad diseminada representa una complicación común en pacientes con SIDA en estado avanzado; aproximadamente un 50% de éstos son más susceptibles a las infecciones por MAC y la probabilidad de que desarrollen el cuadro diseminado es de 10 a 20%, sobre todo cuando su cuenta de linfocitos CD4+ es menor de 50-100 células/mm³. Cabe señalar que el número de casos de esta patología ha venido disminuyendo al aplicarse un mejor cuidado médico, la terapia anti-retroviral altamente activa (HAART) y las medidas profilácticas correspondientes (12).

Los signos y síntomas asociados a la enfermedad diseminada son muy diversos, destacando la fiebre persistente, fatiga, pérdida de peso, anemia, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea. Si bien no se han logrado identificar con claridad las posibles fuentes de infección, las técnicas moleculares han permitido detectar la existencia de MNT (en especial de MAC) en los sistemas de distribución de agua municipales y de los hospitales, en máquinas de hielo u en tanques de oxígeno y aparatos de succión (5, 6, 10, 12, 13).

La transmisión a través del agua potable es muy factible, debido a que *M. scrofulaceum* y las especies del MAC son resistentes a los agentes más utilizados para la desinfección acuifera: cloro, cloramina, dióxido de cloro, ozono y otros desinfectantes comunes tales como los compuestos cuaternarios de amonio, los fenoles y el glutaraldehído (13).

En los pacientes con SIDA, la infección suele adquirirse vía el tracto gastrointestinal; los estudios han mostrado que las micobacterias invaden hígado, bazo, médula ósea y tracto gastrointestinal, alcanzando proporciones de 10⁷-10¹⁰ UFC/g de tejido. En personas con bajas cantidades de células CD4+, los análisis rutinarios de sangre pueden ayudar a detectar la presencia del MAC en fases tempranas, en las que la terapia resulta muy exitosa (12).

Infecciones en piel, huesos y tejidos blandos. Estos padecimientos pueden ocurrir en individuos de cualquier edad y hasta en pacientes aparentemente sanos con fracturas expuestas o intervenidos quirúrgicamente. Su incidencia en individuos inmunocomprometidos ha aumentado y el uso de corticoesteroides representa otro serio factor de riesgo. Entre los principales agentes causales de infecciones de la piel y de tejidos blandos², se cuentan las micobacterias de crecimiento rápido (*M. chelonae* y *M. fortuitum*), el MAC, *M. flavescens*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. terreae*, *M. ulcerans*, *M. vaccae*, *M. wolinskyi* y, con menor frecuencia, *M. kansasii*. En pacientes con inmunodepresión crónica, *M. fortuitum* y *M. chelonae* son las especies responsables del 95% de los casos de infecciones cutáneas (3, 10, 11, 12, 14, 15).

Generalmente, las afecciones tienen su origen en heridas punzantes tales como las que aparecen cuando se pisan clavos contaminados; además, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. nonchromogenicum* han sido identificados como agentes causales de infecciones asociadas a la práctica de la acupuntura (3, 6).

Las manifestaciones clínicas incluyen abscesos que drenan material mucopurulento, úlceras, nódulos, celulitis, pústulas, seromas, lesiones verrugosas, necrosis y granulomas cutáneos que pueden evolucionar a placas endurecidas. Las lesiones son indoloras y comúnmente inician como nódulos violáceos que se ulceran posteriormente; la infección del tejido blando cursa con eritemas, dolor, calor e hinchazón local (4, 6, 12, 15).

² Incluye los ligamentos, tendones y músculos del cuerpo.

El MAC es más común en personas de edad avanzada, aunque también llegan a padecerla niños inmunocompetentes, adultos y pacientes con SIDA; puede ser recurrente, en ocasiones diseminada y se presenta como consecuencia de algún trauma, de procedimientos quirúrgicos o cosméticos, de terapias con esteroides y sarcoidosis. Normalmente se localiza en los tejidos blandos o en la superficie anterior de las manos y muñecas (12).

Frecuentemente los cuadros son mal diagnosticados como artritis u otras enfermedades inflamatorias, administrándose tratamientos con corticoesteroides que originan severas complicaciones, incluyendo osteomielitis, tenosinovitis y artritis séptica. La infección recurrente por MAC se asocia a una delección en el residuo 818 del receptor para IFN- γ (12).

La patología debida a *M. marinum* se conoce como “granuloma del tanque de peces” y tiene su origen en la exposición a agua salada o a agua dulce, aunque los casos reportados también incluyen a personas que tienen peceras, que realizan actividades en la industria pesquera y que trabajan con agua o la utilizan con propósitos recreativos. Entre las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad destacan la formación de nódulos indoloros en las extremidades, los cuales aparecen 2 a 6 semanas después del daño en la piel; la tenosinovitis o tendovaginitis (inflamación aguda o crónica del tendón y de la vaina que lo recubre y protege), se presenta cuando las heridas son penetrantes. En personas inmunocompetentes, las lesiones aparecen en las extremidades y, aunque la infección sistémica es rara, la patología puede alcanzar huesos, articulaciones y tendones (3, 15).

Finalmente, la úlcera de Buruli es ocasionada por *M. ulcerans* y afecta principalmente a niños de 5 a 14 años. Corresponde a una enfermedad necrosante de piel y huesos causada por una familia de toxinas (micolactonas) producidas por dicha especie; se trata de la tercera

enfermedad micobacteriana más común, sólo superada en frecuencia por la tuberculosis y la lepra, y su distribución es mundial, aunque destaca principalmente en regiones con climas tropicales. Se han reportado casos en más de 30 países de África, América Latina, Asia, el Pacífico occidental y Australia; empero, en África Occidental afecta al 22% de la población. Los casos se concentran en zonas geográficas cercanas a ríos, lagos o pantanos y, aunque las formas en las que se adquiere aún no se conocen con exactitud, los estudios epidemiológicos y el uso de métodos moleculares han permitido establecer la posible participación de algunos insectos acuáticos en el ciclo de su transmisión, asegurándose que no existe indicio alguno que sugiera el contagio persona a persona. Los factores de riesgo incluyen al turismo en las zonas endémicas y a la presencia de lesiones cutáneas que entran en contacto con insectos o agua contaminada (16, 17).

La micolactona micobacteriana causa la necrosis de la piel y del tejido subcutáneo y sus efectos inmunosupresores favorecen el avance silencioso de la enfermedad; la falta de fiebre o dolor se suma a la carencia de métodos de diagnóstico que permitan identificar rápidamente al microorganismo, lo que explica porqué las personas afectadas no reciben tratamientos tempranos que posibiliten curaciones exitosas en lapsos menores (16, 17).

Las lesiones implicadas pueden ser no ulcerativas (pápulas, nódulos, placas endurecidas o edema), ulcerativas, cicatrizantes o muy lesivas en huesos. Durante la fase inicial aparece un nódulo indoloro que, en el caso de ser extirpado, detiene la enfermedad. Sin embargo, cuando no se aplica tratamiento adecuado alguno, el nódulo evoluciona hacia una ulceración cutánea masiva que posteriormente provoca la destrucción de huesos y órganos tales como mamas, ojos y genitales, llegándole a originar incapacidad permanente a un 25% de los enfermos (16, 18).

La terapéutica con antibióticos no es efectiva cuando ya se ha desarrollado la úlcera y, en este sentido, los autores consideran que es probable que el microorganismo no esté presente en las lesiones o que la destrucción del tejido subcutáneo impida la entrada de los fármacos (17, 18).

Enfermedades nosocomiales. Las manifestaciones clínicas implicadas dependen en gran medida de la especie implicada, de la ruta de infección y de las condiciones médicas subyacentes. Por ejemplo, la afección del tracto respiratorio por *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. xenopi*, se asocia a la presencia de estos microorganismos en los sistemas de abastecimiento de agua, máquinas de hielo, albercas de hidroterapia e instrumental médico, aunque también se han reportado infecciones por *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae* en pacientes sometidos a diálisis, debido al agua o soluciones empleadas para “limpiar” los filtros y reutilizarlos (6, 10).

Otra infección frecuente es la de piel y huesos; suele localizarse en los sitios de inyección y tiene su origen en el empleo de soluciones contaminadas, figurando las cuatro especies antes mencionadas. En el caso de pacientes con SIDA y enfermedad diseminada, se ha demostrado que los agentes causales provienen hasta del agua del propio hospital (6).

Las especies *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. gordonae* y *M. chelonae* han sido aisladas de endocarditis posteriores a cirugías cardíacas y de infecciones en incisiones quirúrgicas, asociadas al agua contaminada o a inadecuada esterilización del equipo quirúrgico. Otros trastornos intrahospitalarios incluyen celulitis, infección de la pared abdominal, meningitis, infección espinal y otitis media, todas las cuales parecen tener origen en cirugías dermatológicas, reparación de hernias, toma de biopsias, uso de catéteres peritoneales,

inyecciones y cirugías cosméticas (rinoplastías, liposucción, mamoplastías de aumento y blefaroplastías) (10, 11, 12).

Las infecciones derivadas del uso de catéteres también son comunes y se presentan más frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos; el proceso patológico puede afectar al sitio de entrada, al túnel bajo la piel donde está colocado el catéter y/o al torrente circulatorio. Generalmente, el agente etiológico es *M. fortuitum*, aunque también se ha detectado a *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. immunogenum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. smegmatis* y *M. septicum*, entre otras especies (10).

FACTORES DE VIRULENCIA

La detección y caracterización de los mecanismos moleculares asociados a la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por MNT avanzan consistentemente y los logros obtenidos en esta materia están resultando trascendentales, no sólo para entender los procesos relacionados con la patología, sino también porque se están identificando potenciales “blancos” para la terapéutica.

Los factores de virulencia son determinantes para la colonización y proliferación micobacteriana en el hospedero, por lo que pueden catalogarse como indispensables para la supervivencia del patógeno y la patogenia de la afección. Entre los que caracterizan a las MNT destacan los siguientes:

Micolactonas. Son macrólidos integrantes de una pequeña familia de toxinas lipofílicas que están constituidas por una cadena de policétidos, la cual se encuentra esterificada a un

segmento central de 12 átomos. Sus principales representantes son las micolactonas A y B, producidas específicamente por *M. ulcerans*, especie para la que representan un trascendental factor que sustenta la supervivencia micobacteriana en las glándulas salivales de diversos insectos, principalmente en aquéllos que caracterizan a las zonas geográficas en donde la úlcera de Buruli se considera endémica (17, 18).

Las colonias de las cepas que producen micolactonas presentan una coloración amarilla pálida, muy diferente al tinte blanco que se evidencia en las mutantes micolactona negativa. Esta clase de compuestos parece tener actividad citotóxica, analgésica e inmunosupresora y a ellos se les atribuye la ausencia de respuestas inflamatorias durante la enfermedad; de hecho, de acuerdo con lo observado en modelos *in vivo*, la inyección subcutánea de micolactona purificada reproduce la patología causada por *M. ulcerans*³ (10, 17).

A nivel de las células del hospedero, estas sustancias inducen alteraciones en el citoesqueleto, antes de detener el ciclo celular en la fase G₀/G₁ y de provocar la muerte celular mediante apoptosis, vía la activación de las caspasas. Dado que son moléculas pequeñas e hidrofóbicas, parecen ingresar a la célula mediante difusión pasiva, sin requerir algún receptor; se acumulan en el citoplasma –no en el núcleo– uniéndose lenta pero irreversiblemente a un subconjunto de proteínas citoplásmicas (19).

La síntesis de estas moléculas depende de moléculas proteicas que están codificadas en un grupo de seis genes residentes en el plásmido pMUM001 de 174 kb, rico en secuencias de inserción y con importante homología en la mayor parte de sus cadenas, lo que implica

³ Las variantes micolactona negativa son avirulentas, lo que refuerza las apreciaciones en el sentido de que la toxina desempeña un papel fundamental en la patogénesis.

cierta inestabilidad y evolución reciente, esto último con base en múltiples eventos de recombinación y duplicación (20, 21).

Si bien se han recuperado micolactonas relativamente homogéneas de las cepas aisladas en diferentes regiones geográficas, existe heterogeneidad en cuanto a la estructura y citotoxicidad de las asociadas a distintas clonas de *M. ulcerans*, en congruencia con sus distintos grados de virulencia y de capacidad invasiva del organismo humano (20, 21).

La envoltura celular micobacteriana. A ésta se le considera el principal factor de virulencia de las MNT; actúa como una importante barrera de permeabilidad para moléculas polares, lo que además confiere resistencia micobacteriana a la acción de ácidos, álcalis e hipoclorito. Se encuentra conformada por una capa interna de peptidoglicanos y de polisacáridos arabinogalactanos, a la cual rodea la capa externa constituida por proteínas, carbohidratos y lípidos, todos los que influyen para conferir carga negativa a la superficie bacteriana, al margen de su participación como “ligandos” de unión a macrófagos. Además, los ácidos micólicos inducen diferentes respuestas por parte del hospedero y otros diversos componentes expuestos son reconocidos por ciertos receptores celulares, facilitando a la bacteria su establecimiento y multiplicación. Los principales compuestos implicados en estas vitales tareas son los siguientes (22):

Glicopeptidolípidos (GPL). Son los constituyentes predominantes de la envoltura de numerosas MNT, aparentemente son específicos para cada especie y apoyan la evasión de los mecanismos antibacterianos macrofágicos; en este sentido, se acumulan dentro del fagosoma durante el crecimiento intracelular micobacteriano, lo que da lugar a una especie de “cápsula” que rodea y protege a las MNT de la acción de las especies reactivas de

oxígeno producidas por el fagocito. Adicionalmente, los GPL tipo C presentes en patógenos oportunistas para el humano (*M. avium intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*) son responsables de la variación antigénica, factor importante para la evasión de la respuesta inmune (22).

Lipomananas (LMs) y *lipoarabinomananas (LAMs)*. Estos lipoglicanos complejos parecen promover la supervivencia de las micobacterias, interactuando con diferentes células del hospedero, regulando la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, inhibiendo la actividad microbicida de los macrófagos e impidiendo la proliferación de los linfocitos T. Las LAMs se han aislado a partir de especies de crecimiento rápido, sus propiedades dependen de sus respectivas características estructurales y se constituyen por tres dominios estructurales: el fosfatidil-*mio*-inositol, un centro de D-manana y el terminal de D-arabinana que puede contener un residuo manosil o fosfoinositol (23, 24).

Las diversas formas de LAMs han sido implicadas en un amplio rango de funciones biológicas, incluidas las inhibiciones de la proliferación de los linfocitos T y de la actividad microbicida de los macrófagos, así como la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (EROS) (25).

De hecho, se les ha clasificado como modulinas, ya que manipulan al sistema inmune del hospedero y desencadenan múltiples vías de señalización que controlan la apoptosis y la producción de IL-12, tanto en macrófagos como en células dendríticas (23, 25).

Las mencionadas dos clases celulares del hospedero presentan receptores tipo toll (TLR), especialmente los TLR2 y TLR4, los cuales reconocen a diferentes componentes de la pared

celular micobacteriana y, secuencialmente, activan factores que inician la transcripción de los genes que codifican para diversas citocinas pro-inflamatorias. Por ejemplo, el CD14, otro receptor asociado al TLR2, induce la producción de TNF- α , IL-8, IL-6, IL-12 y de la propia apoptosis, previa unión a la PILAM (una clase de LAMs). También se ha observado que cuando el proceso involucra a una LM, los macrófagos expresan sus proteínas CD40 y CD86 y sintetizan al radical óxido nítrico (NO \cdot) (23, 24, 26).

Por su parte, la ManLAM (una segunda clase de LAMs) es anti-inflamatoria y, al unirse al receptor de manosa (MR) o al DC-SIGN (receptor específico de lectina tipo-C en las células dendríticas), permite a la bacteria sobrevivir dentro de los macrófagos, provocando las respuestas que se mencionan a continuación (23, 24, 25, 26):

- Disminución en la producción de IL-12 y TNF- α por parte de macrófagos y células dendríticas.
- Inhibición de la respuesta al IFN- γ .
- Prevención de la maduración de las células dendríticas.
- Inducción de la producción de IL-10.
- Incapacidad para inducir apoptosis.

De acuerdo con ello, las enzimas que participarían en la síntesis de la LAM –a partir de una LM–, serían determinantes para la virulencia de las micobacterias. Finalmente, también se ha sugerido que las ManLAM inhiben la fusión del fagosoma al lisosoma, lo que impediría que éste vertiera sus agentes oxidantes y diversas enzimas líticas sobre las MNT que se reproducen intracelularmente (26).

Dado que los LMs y LAMs coexisten en la pared celular de las micobacterias, la proporción en la que se encuentran podría ser importante en lo tocante a su capacidad para modular la respuesta inmune y la apoptosis, potenciando el proceso infectivo (23).

Ácidos micólicos. Éstos representan un tercio de la masa seca de la envoltura celular y corresponden a cadenas de ácidos grasos de alto peso molecular, esterificados a los arabinogalactanos de la pared celular. Confieren al microorganismo una gran resistencia al daño químico y a la deshidratación, así como baja permeabilidad a diversos antibióticos y a sustratos hidrofílicos (27).

Ciertas modificaciones estructurales del meromicolato, inducidas por metiltransferasas, son importantes para la impermeabilidad de la pared celular y, por lo tanto, para la virulencia. En las cepas patógenas, dichos cambios también pueden ser promovidos por la expresión de genes cuyos productos introducen grupos ciclopropilo en posiciones relativamente conservadas de la cadena de meromicolato; por ejemplo, la sintasa codificada por el gen *mmaA2* coloca un ciclopropano en posición distal, aumentando la resistencia de *M. smegmatis* al daño oxidativo; análogamente, si aquel es insertado en la posición proximal, lo que se incrementa es la impermeabilidad (27, 28).

Cuando la bacteria crece dentro de los macrófagos y/o en el tejido pulmonar, la cantidad de cetomicolatos es mayor, lo que sugiere la posibilidad de que esta clase de micolatos resulte importante para la supervivencia micobacteriana. De hecho, en las mutantes de *M. smegmatis* que acumulan meromicolatos incompletos, aumentan notablemente la permeabilidad y la fluidez de la pared (27).

Los genes *kasA* y *kasB* son fundamentales para la elongación de los micolatos: el primero codifica para una enzima que cataliza la extensión inicial de las cadenas y, el segundo, permite que éstas alcancen su tamaño final, lo que globalmente se traduce en la disminución de la permeabilidad de la pared celular y, por ende, en la reducción de la susceptibilidad micobacteriana, tanto a los mecanismos de inmunidad innata asociados a la lisozima y las defensinas (péptidos antimicrobianos presentes en distintos tipos celulares, incluidos los neutrófilos y macrófagos), como a diversas moléculas hidrofóbicas, incluidos numerosos antibióticos. Estudios recientes realizados con *M. marinum* revelan que *kasB* impide la fusión fagolisosomal (27, 29).

Glicanos. Son los componentes predominantes en una capa de la envoltura celular equivalente a la cápsula de otras bacterias. Sus residuos de glucosa, manosa y arabinos podrían estar involucrados en las interacciones iniciales de las MNT con los macrófagos y neutrófilos, aunque dicha capa también resulta importante para la supervivencia micobacteriana dentro de las células del hospedero ya que, inclusive, está considerada entre los factores a través de los cuales el microorganismo llega a “controlar” el sitio anatómico infectado (22).

2,3-Di-O-aciltrehalosa (DAT). Corresponde a un glicolípido localizado en la capa exterior de la envoltura celular cuya estructura está formada por dos cadenas de ácidos grasos y dos α -glucosas. En virtud de que no se encuentra unido covalentemente a los peptidoglicanos, puede interactuar con las células del hospedero e insertarse en la membrana de estas últimas, alterando su funcionamiento global, se trate o no de células fagocíticas. Estudios realizados con *M. fortuitum* han revelado que estos residuos inducen una respuesta humoral (la cual en las micobacterias es inofensiva) y ejercen una acción inhibitoria en cuanto a la proliferación de linfocitos T mediada por mitógenos (30).

Algunos otros glicolípidos suprimen la función de los linfocitos T, lo que afecta tanto a las células citotóxicas como a las presentadoras de antígeno; los mecanismos implicados incluyen la interferencia del proceso de presentación y la liberación de factores inhibidores tales como la PGE-2. Al parecer, los efectos inmunomoduladores de los glicolípidos son inespecíficos y se relacionan con daños en la membrana de las células del sistema inmune, vía su inserción en ella (30).

Fosfolipasas. Manifiestan un amplio espectro de efectos *in vivo* e *in vitro*, los cuales incluyen desde alteraciones menores en la membrana celular hasta fenómenos letales. Estas enzimas se dividen en cuatro grupos: A1, A2, C y D, dependiendo de la posición del enlace que hidrolizan en la molécula de sustrato; a este respecto, los últimos dos han mostrado una participación importante en la patogénesis de las micobacteriosis (11, 29).

La fosfolipasa C (PlcC) es un factor de virulencia que también se ha detectado en *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*. Su actividad se ha reportado en extractos de MNT patógenas tales como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. ulcerans* y *M. marinum*, proponiéndose que propicia la degradación de la membrana del fagosoma y la modulación de la respuesta inmune, vía la activación de la cascada del ácido araquidónico, encargada de la transducción de señales en las células invadidas. Su expresión aumenta en macrófagos infectados, lo que sugiere algún papel relevante en la patogénesis (11, 29).

Supervivencia micobacteriana en el interior de los macrófagos. Las micobacterias patógenas difieren de las no virulentas en cuanto a que invaden las células del hospedero

con mayor eficacia, debido a que se adhieren a diversas moléculas presentes en la superficie “blanco” y a su notable capacidad para reproducirse intracelularmente (10, 31, 32).

Utilizando como modelo a *M. marinum* (especie cercana genéticamente a *M. tuberculosis*), se han logrado identificar dos *loci*, denominados *mel1* y *mel2*, los cuales aumentan la capacidad micobacteriana para infectar macrófagos. Ambos están constituidos por 11 genes y codifican para componentes membranales o de secreción y para lípidos involucrados en la adherencia e ingreso a las células del hospedero (16).

En *M. avium* se ha detectado una proteína cuya secuencia de aminoácidos es similar a la de la hemaglutinina de unión a heparina de *M. tuberculosis*: ambas se unen al componente C3 del complemento y su carga positiva les permite reaccionar con las moléculas con carga negativa situadas sobre la superficie de los macrófagos, e inclusive, fijarse a glicoconjugados sulfatados tales como la heparina, lo que adiciona otra vía para que el microorganismo logre adherirse a la célula “blanco” y a los componentes de la matriz extracelular, como paso previo a su internalización en las células del hospedero. En este sentido, cabe subrayar que, en general, todas las micobacterias virulentas son intracelulares facultativas y que su crecimiento ocurre preferentemente en el interior de los fagosomas de la serie monocito-macrófago (7, 32).

La “captura” de *M. avium* por parte de macrófagos y células dendríticas se asocia a diversos receptores ubicados en la superficie de dichos fagocitos, destacando algunas integrinas y los receptores CR3, CR4, así como los de vitronectina y de manosa, aunque el microorganismo también se puede unir a la fibronectina vía su antígeno 85. Éste corresponde a un complejo de tres proteínas (85A, 85B y 85C) que actúa de dos maneras (28, 33):

- Como micololtransferasa (el antígeno 85C), ya que transfiere cadenas de ácidos micólicos a los derivados de trehalosa –para que funcionen como inmunomoduladores– y cataliza la síntesis de micolatos de la pared celular para mantener la permeabilidad y fluidez de la envoltura celular.
- Como internalizador micobacteriano, en virtud de que inducen el ingreso del microorganismo a los macrófagos, a través del mecanismo de fagocitosis mediada por complemento.

Una vez dentro de la célula hospedera, las micobacterias viven y crecen dentro del fagosoma sin que ocurra su acidificación ni la fusión fagolisosomal. Sorprendentemente, la bacteria interfiere la señalización en el macrófago, creando un microambiente adecuado para su propia supervivencia, que la hace resistente a los mecanismos oxidativos del fagocito. Esta situación parece deberse a que, después de 24-48 h, se activan promotores micobacterianos asociados a actividades biológicas tales como síntesis de nucleótidos, replicación del ADN, síntesis de policétidos, traducción de proteínas y degradación de macromoléculas (31, 32, 33).

Inhibición de la formación del fagolisosoma. Normalmente, una bacteria es internalizada a los fagocitos dentro de vesículas denominadas fagosomas, las cuales se acidifican y se fusionan con los lisosomas, dando lugar a estructuras conocidas como fagolisosomas o lisosomas secundarios. El proceso depende de la expresión de proteínas trascendentales: la membrana del fagosoma expresa componentes específicos de superficie tales como Rab5, correspondiente a una GTPasa que regula el acoplamiento y fusión de membranas del endosoma temprano y recluta numerosos efectores –entre los cuales destaca el antígeno del

endosoma temprano 1– que estabilizan la estructura; posteriormente, el fagosoma pierde estos marcadores y adquiere otros, incluidos Rab7 y diversas glicoproteínas, que median el ensamble y la fusión fagosoma-lisosoma (32, 34).

En contraparte, las micobacterias impiden esta última fusión a fin de poder crecer dentro del fagosoma macrofágico; para ello, interfieren el reciclaje de las proteínas Rab (evitando la adquisición de marcadores del endosoma tardío), retienen a las proteínas de unión a actina coronín 1 (conocidas como TACO o P57), cuya participación se ha comprobado en la organización del citoesqueleto y la fusión de vesículas, pero también desorganizan la red de filamentos de actina encargada de dar dirección al endosoma hacia su “sitio blanco (31, 34).

Otros mecanismos que inhiben la evolución del fagosoma hacia fagolisosoma, son (10, 31, 33, 35):

- La inhibición de la transcripción y síntesis relacionadas con enzimas lisosomales proteolíticas –como la catepsina D– y el aumento de la expresión de la $\alpha 1$ antitripsina.
- La inhibición de la expresión de la H^+ -ATPasa, que actúa como bomba de protones en la superficie del fagosoma, lo que impide la acidificación de las vacuolas que contienen a la micobacteria.
- La interferencia del tráfico de proteínas provenientes del complejo de Golgi y la inhibición de respuestas inducidas por el IFN.
- La activación de genes específicos que permiten a las micobacterias sobrevivir dentro del fagolisosoma.

Adicionalmente, las serín/treonín proteín cinasas (Pkn) tienen una participación importante en la supervivencia de la micobacteria dentro del macrófago, inhibiendo la fusión fagolisosomal. Entre las más estudiadas destaca la PknG, la cual no presenta dominios transmembranales, se localiza en el citoplasma y está codificada por el gen *pknG*. En este contexto, se ha observado que las micobacterias avirulentas no expresan la proteína PknG, lo que permite que la formación del fagolisosoma ocurra rápidamente y que los bacilos mueran por efecto de los compuestos bactericidas presentes; por el contrario, las cepas patógenas expresan la enzima, tardan una hora en ser internalizadas en el macrófago y proliferan en su interior, al impedirse la fusión del lisosoma-fagosoma. Esa modulación asociada a la PknG podría ocurrir vía la fosforilación de las proteínas del fagocito; por otro lado, los experimentos implicados han demostrado un claro incremento en la secreción de la enzima una vez que la micobacteria ha sido internalizada (35).

Escape del fagosoma. A pesar de la similitud existente entre las distintas micobacterias patógenas, se ha logrado establecer que sólo algunas cepas de *M. marinum* son capaces de escapar del fagosoma y liberarse hacia el citoplasma; también sorprende su comportamiento posterior, análogo al de *Shigella sp* y *Listeria monocytogenes*: durante el escape adsorbe colas de actina de la membrana fagosómica y adquiere movilidad mediante la polimerización-despolimerización de dicha proteína contráctil, tal como si se tratara de una cometa. Ello propicia su propagación intercelular hacia otras células del tejido, sin entrar en contacto con el medio extracelular (29).

COMENTARIOS FINALES

Los métodos moleculares de diagnóstico ofrecen muchas ventajas en comparación con las técnicas convencionales: los resultados son obtenidos rápidamente, son confiables,

reproducibles y, aún cuando las muestras y cultivos se encuentren contaminados con otros microorganismos, pueden ser analizados confiablemente. El “blanco” molecular de esta clase de metodologías suele consistir en ciertas secuencias de ARNr y/o en los genes que codifican para sus respectivas síntesis.

En general, las principales estrategias para tratar las enfermedades producidas por MNT son la intervención quirúrgica y/o la administración de antibióticos, complementadas con adecuados protocolos de nutrición e hidratación adecuada, los cuales permitan mantener o reestablecer un buen estado nutricional.

La cirugía está indicada para manejar la linfadenitis cervical, algunas infecciones localizadas originadas por micobacterias resistentes tales como *M. scrofulaceum*; desde luego, la resección parcial del pulmón representa una alternativa importante en el caso de las afecciones neumónicas. Otros recursos quirúrgicos son apropiados cuando ha ocurrido la acumulación de pus o la necrosis del tejido, lo que caracteriza a ciertas infecciones debidas a *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. marinum* y *M. ulcerans*.

Por lo que respecta al empleo de antibióticos, éste se considera que presenta diversas limitaciones, debido a que los regímenes suelen resultar prolongados y hasta inefectivos, ya que los fármacos implicados provocan efectos secundarios significativos y aproximadamente 20 especies de MNT de importancia clínica muestran patrones de susceptibilidad diferentes, lo que obliga a realizar pruebas de susceptibilidad y/o a instituir tratamientos combinados, conformados con tres a cinco antimicrobianos -según la gravedad del caso-, para evitar que suceda la selección de mutantes resistentes. Frecuentemente, se

recomienda prescribir una terapia antituberculosa bisemanal que incluya fármacos de primera línea, tales como isoniazida, rifampicina, etambutol o pirazinamida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chamberlin W., Graham D., Hulten K., El-Zimaity H. M. T., Schwartz M., Naser S., Shafran I. and El-Zaatari F.: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease, *Aliment Pharmacol Ther*, 2001; 15(3): 337-346.
2. Hazra R., Floyd M., Sloutsky A. and Husson R.: Novel *Mycobacterium* related to *Mycobacterium triplex* as a cause of cervical lymphadenitis, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(4): 1227–1230.
3. Katoch V.M.: Review article infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM), *Indian J Med Res*, 2004; 120: 290-304.
4. Theodorou D., Theodorou S., Kakitsubata Y., Sartoris D. and Resnick D.: Imaging characteristics and epidemiologic features of atypical Mycobacterial infections involving the musculoskeletal system, *AJR*, 2001; 176: 341-349.
5. Falkinham III J., Norton C. D. and LeChevallier M.: Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems, *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(3): 1225–1231.
6. Phillips M. and von Reyn C.F.: Nosocomial infections due to Nontuberculous *Mycobacteria*, *CID*, 2001; 33: 1363-1374.
7. Wieland C.W., Florquin S., Pater J.M., Weijer S. and van der Poll T.: Interleukin-1 contributes to an effective clearance of *Mycobacterium kansasii* from the respiratory tract, *Microbes & Infect*, 2006; 8: 2409-2413.
8. Hanak V., Kalra S., Aksamit T.R., Hartman T.E., Tazelaar H.D. and Ryu J.H.: Hot tub lung: Presenting features and clinical course of 21 patients, *Resp Med*, 2006; 100: 610-615.
9. Goy G., Thomas V., Rimman K., Jatón K., Prod'hom G. and Greub G.: The Neff strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool for the testing the virulence of *Mycobacterium kansasii*, *Res Microbiol*, 2007, 158:393-397.
10. Greenwell-Wild T., Vázquez N., Sim D., Schito M., Chatterjee D., Orenstein J. and Wahl S.: *Mycobacterium avium* infection and modulation of human macrophage gene expression, *J Immunol*, 2002; 169: 6286–6297.
11. Raynaud C., Guilhot C., Rauzier J., Bordat Y., Pelicic V., Manganelli R., Smith I., Gicquel B. and Jackson M.: Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol Microbiol*, 2002; 45(1): 203–217.
12. Primm T., Lucero C. and Falkinham III J.: Health impacts of environmental *Mycobacteria*, *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17(1): 98–106.
13. Falkinham III J.: Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*, *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69(9): 5685–5689.
14. Bartralot R., García-Patos V., Sitjas D., Rodríguez-Cano L., Mollet J., Martín-Casabona N., Coll P., Castells A. and Pujol R.: Clinical patterns of cutaneous nontuberculous mycobacterial infections, *Br J Dermatol*, 2005; 152: 727–734.
15. Gordon M., Wilson H., Duthie F., Jones B. and Field M.: When typical is atypical: mycobacterial infection mimicking cutaneous vasculitis, *Rheumatology*, 2002; 41: 685-690.

16. Petrini B.: *Mycobacterium marinum*: ubiquitous agent of waterborne granulomatous skin infections, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006; 25: 609-613.
17. Asiedu K. and Wansbrough-Jones M.: *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli or Bairnsdale ulcer): challenges in developing management strategies, *MJA*, 2007; 186(2): 55-56.
18. O'Brien D.P., Hughs A.J., Cheng A.C., Henry M.J., Callan P., McDonald A., Lotlen I., Birrel M., Sowerby J.M., Johnson P.D.R. and Athan E.: Outcomes for *Mycobacterium ulcerans* infection with combined surgery and antibiotic therapy: findings from a south-eastern Australian case series, *MJA*, 2007; 186(2): 58-61.
19. Snyder S. and Small P.L.C.: Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Mycobacterium ulcerans*, *Microb Pathog*, 2003; 34: 91-101.
20. Stinear T., Hong H., Frigui W., Pryor M., Brosch R., Garnier T., Leadlay P. and Cole S.: Common evolutionary origin for the unstable virulence plasmid pMUM found in geographically diverse strains of *Mycobacterium ulcerans*, *J Bacteriol*, 2005; 187(5): 1668-1676.
21. Stinear T., Mve-Obiang A., Small P., Frigui W., Pryor M., Brosch R., Jenkin G., Johnson P., Davies J., Lee R., Adusumilli S., Garnier T., Haydock S., Leadlay P. and Cole S.: Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*, *PNAS*, 2004; 101(5): 1345-1349.
22. Stokes R., Norris-Jones R., Brooks D., Beveridge T., Doxsee D. and Thorson L.: The Glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages, *Infect Immun*, 2004; 72(10): 5676-5686.
23. Dao D., Kremer L., Guerardel Y., Molano A., Jacobs Jr. W., Porcelli S. and Briken V.: *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages, *Infect Immun*, 2004; 72(4): 2067-2074.
24. Vignal C., Guerardel Y., Kremer L., Masson M., Legrand D., Mazurier J. and Ellass E.: Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* Induce TNF- α and IL-8 secretion by a CD14-Toll-like receptor 2-dependent mechanism, *J Immunol*, 2003; 171: 2014-2023.
25. Guerardel Y., Maes E., Briken V., Chirat F., Leroy Y., Loch C., Strecker G. and Kremer L.: Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*. Novel structural features and apoptosis-inducing properties, *J Biol Chem*, 2003; 278(38): 36637-36651.
26. Briken V., Porcelli S., Besra G. and Kremer L.: MicroReview, Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response, *Mol Microbiol*, 2004; 53(2): 391-403.
27. Gao L., Laval F., Lawson E., Groger R., Woodruff A., Morisaki J., Cox J., Daffe M. and Brown E.: Requirement for *kasB* in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy, *Mol Microbiol*, 2003; 49(6): 1547-1563.
28. Chen L., Yang J., Yu J., Yao ZJ., Sun LL., Shen Y. and Jin Q.: VFDB: a reference database for bacterial virulence factors, [Nucleic Acids Res.](#), 2005; [33\(Database issue\):D325-328.](#)
29. Stamm L. and Brown E.: *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium, *Microbes Infect*, 2004; 6: 1418-1428.
30. Saavedra R., Segura E., Leyva R., Esparza L. and López-Marín L.: Mycobacterial Di-O-Acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine t cells in vitro, *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001; 8(6): 1081-1088.

31. Bartos M., Falkinha O. and Pavlir I.: Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in *mycobacteria* – a review, *Vet Med-Czech*, 2004; 49(5): 161–170.
32. Torrado E., Fraga A.G., Castro A.G., Stragier P., Meyers W.M., Portaels F., Silva M. and Pedrosa J.: Evidence of an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*, *Infect & Immun*, 2007; 75(2): 977-987.
33. Danelishvili L., Poort M. and Bermudez L.: Identification of *Mycobacterium avium* genes up-regulated in cultured macrophages and in mice, *FEMS Microbiol Lett*, 2004; 239: 41–49.
34. Amer A. and Swanson M.: A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage, *Curr Opin Microbiol*, 2002; 5: 56–61.
35. Walburger A., Koul A., Ferrari G., Nguyen L., Prescianotto-Baschong C., Huygen K., Klebl B., Thompson C., Bacher G. and Pieters J.: Protein kinase G from pathogenic *mycobacteria* promotes survival within macrophages, *Science*, 2004; 304: 1800-1804.