

Evaluación de la capacidad invasiva de las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido mediante el estudio de la morfología de las microcolonias en fibroblastos

Jaime Esteban, Ignacio Gadea, Nieves Zamora, Alberto Ortiz y Ricardo Fernández-Roblas

Departamento de Microbiología Clínica. Fundación Jiménez Díaz-UTE. Madrid. España.

OBJETIVOS. Se evaluó la capacidad invasiva de aislamientos clínicos y de colección de varias especies de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido mediante el análisis de las microcolonias en cultivo de fibroblastos diploides humanos, y se comparó la misma con el fenotipo de colonias en medio de Middlebrook 7H11 y con el significado clínico de los aislamientos.

MÉTODOS. Se analizaron 29 cepas de: *Mycobacterium chelonae* (8), *M. fortuitum* (6), *M. peregrinum* (5), *M. abscessus* (5), *M. mucogenicum* (4) y *M. septicum* (1), tanto clínicamente significativas como de colección. Se evaluó el fenotipo liso o rugoso de las colonias en Middlebrook 7H11. Se evaluó la capacidad de invasión intracelular mediante el ensayo de microcolonias en fibroblastos descrito por Shepard. Las características cuantitativas se compararon con el test de la t de Student y las características cualitativas con el test exacto de Fisher.

RESULTADOS. No se encontraron diferencias significativas entre colonias de fenotipos distintos o cepas con diferentes significados clínicos, excepto en dos aislamientos de *M. chelonae* de bacteriemia relacionados con catéteres, que presentaron microcolonias alargadas en el cultivo celular. Las cepas de *M. fortuitum* y *M. peregrinum* presentaron microcolonias más grandes y de apariencia desflecada, mientras que las de *M. chelonae*, *M. abscessus* o *M. mucogenicum*, presentaron unas colonias más pequeñas y de apariencia redondeada.

CONCLUSIÓN. La capacidad invasiva está presente solamente en unas pocas cepas de micobacterias, y esta característica no aparece en la mayoría de las cepas aisladas de infecciones en humanos y en ninguna de las que no fueron clínicamente significativas, por lo que no sería una característica esencial para que los diversos aislamientos sean causa de enfermedad en humanos.

Palabras clave: *Mycobacterium*. Crecimiento rápido. *Mycobacterium chelonae*. *Mycobacterium fortuitum*. Capacidad invasiva. Intracelular. Patogenia.

Assessment of the invasiveness of rapidly-growing nonpigmented mycobacteria with the fibroblast microcolony assay

OBJECTIVE. The invasive capacity of rapidly-growing nonpigmented mycobacteria strains was evaluated by means of a fibroblast microcolony assay and related to the colony phenotype on Middlebrook 7H11 and to the clinical significance of the isolates.

METHODS. Twenty-nine strains [*Mycobacterium chelonae* (8), *M. fortuitum* (6), *M. peregrinum* (5), *M. abscessus* (5), *M. mucogenicum* (4) and *M. septicum* (1)], proceeding from a bacterial collection and clinical isolates, were evaluated. The smooth or rough phenotype of the colonies was assessed in Middlebrook 7H11 medium. Intracellular invasiveness was determined by the fibroblast-microcolony assay described by Shepard. Quantitative culture characteristics were compared with Student's t-test, and qualitative characteristics with Fisher's exact test.

RESULTS. No significant differences were found between colonies with different phenotypes or strains having a different clinical significance, except for two strains of *Mycobacterium chelonae* isolated from cases of catheter-related bacteremia, which showed elongated microcolonies. *M. fortuitum* and *M. peregrinum* strains showed larger microcolonies than *M. chelonae*, *M. abscessus* and *M. mucogenicum*, and displayed a fluffy appearance, while the latter two strains showed rounded colonies.

CONCLUSION. Very few strains of mycobacteria had invasive capacity and the majority of strains isolated from human infections do not show this characteristic; hence this trait is not essential for mycobacteria to cause infection in humans.

Key words: *Mycobacterium*. Rapidly-growing. *Mycobacterium chelonae*. *Mycobacterium fortuitum*. Invasive capacity. Intracellular. Pathogenesis.

Introducción

Las micobacterias atípicas causan diversos tipos de enfermedades tanto en pacientes inmunodeprimidos como inmunocompetentes. Entre este grupo de organismos, las

Correspondencia: Dr. J. Esteban.
Departamento de Microbiología Clínica.
Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: jesteban@fjd.es

Manuscrito recibido el 23-1-2006; aceptado el 29-3-2006.

micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR) se encuentran entre las especies aisladas con más frecuencia en el laboratorio. Además, son la causa de varios síndromes tales como infecciones en heridas y tejidos blandos, tracto respiratorio, infecciones osteoarticulares y bacteriemias relacionadas con el uso de catéteres¹. Muchas de estas infecciones están relacionadas con la presencia de cuerpos extraños. Las especies pertenecientes a este grupo asociadas a infecciones con mayor frecuencia son *Mycobacterium abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, aunque en muchos casos estas bacterias pueden aislarse en muestras sin poseer ningún significado clínico. *M. peregrinum* y *M. mucogenicum* se aíslan, en la mayoría de las ocasiones, como colonizadoras o contaminantes más que como verdaderos patógenos, aunque en algunos casos sí pueden ser consideradas como la causa de la infección^{1,2}.

A pesar de la importancia de estas bacterias como patógenos humanos, hay muy pocos estudios que hayan investigado la presencia de factores de patogenidad en las mismas^{3,5}. Uno de estos estudios no sólo mostraba las diferentes características fenotípicas entre cepas patógenas y no patógenas de *M. abscessus*, sino, además, diferencias en la capacidad de invasión intracelular utilizando un modelo de infección en ratón y otro modelo de estudio de microcolonias en fibroblastos⁵. Con el fin de evaluar la capacidad de invasión de diversas especies micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido, hemos utilizado el modelo de estudio de microcolonias de fibroblastos con cepas de 5 especies, procedentes tanto de muestras clínicas como de colección, y hemos correlacionado los resultados de este estudio con el fenotipo de los aislamientos y con su significado clínico en humanos, para evaluar la frecuencia de la presencia de la capacidad invasiva de las cepas, su relación con el fenotipo de las colonias, y su posible implicación en la producción de enfermedad clínica en los mismos.

Material y métodos

Cepas de micobacterias

Se emplearon las cepas de colección *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. peregrinum* ATCC 14467, *M. abscessus* DSMZ 44196, *M. mucogenicum* DSMZ 44124 y *M. septicum* ATCC 700731. Se estudiaron aislamientos clínicos de las siguientes especies: *M. abscessus* (4 cepas) y *M. chelonae* (7 cepas), *M. fortuitum* (5 cepas), *M. peregrinum* (4 cepas), y *M. mucogenicum* (3 cepas). Se seleccionó un único aislamiento de cada paciente. La identificación de las especies se desarrolló utilizando tanto pruebas bioquímicas habituales como PCR-RFLP del gen *hsp65* de acuerdo con el protocolo de Telenti et al modificado⁶. Las cepas fueron congeladas a -70 °C después de su primera identificación hasta que el estudio fue realizado. El significado clínico de las cepas se estimó en función de las características clínicas de los pacientes y la evaluación se desarrolló de acuerdo a los criterios habituales utilizados⁷. Mucho de estos casos han sido publicados con anterioridad⁸⁻¹⁰.

Suero

El suero fue obtenido de pacientes sin enfermedad tuberculosa, congelado y almacenado a -20 °C.

Medios de cultivo

Se usó agar Middlebrook 7H11 sin antibióticos (BD, Franklin Lakes, EE.UU.) para el cultivo de especies de micobacterias. En los cul-

tivos tisulares se emplearon los medios de Iscove (Sigma, St. Louis, EE.UU.) y el Medio Esencial Mínimo modificado de Eagle (EMEM) (ICN-Flow, High Wycombe, Gran Bretaña).

Inóculo de micobacterias

Las micobacterias se inocularon en placas de agar Middlebrook y se incubaron a 30 °C durante 7 días. Las bacterias se suspendieron entonces en medio de Iscove-Suero humano (50%), se agitaron en el vórtex con perlas de vidrio estériles durante 30 s y se sonicaron a baja potencia (sonicador Bandelin Sonorex TK 52, Bandelin Electronic, Berlín, Alemania) durante 5 min. Posteriormente, las bacterias fueron preposonizadas en el suero humano de Iscove (50%) a 37 °C durante 30 min. Después de 15 min de sedimentación, se realizó una dilución equivalente al 0,5 de turbidez en la escala de MacFarland en PBS estéril. Finalmente, se realizaron ocho diluciones seriadas 1:10 en medio de Iscove para contar las bacterias viables mediante incubación de 100 µl de dichas suspensiones en medio de Middlebrook 7H11 incubado 3 días a 30 °C.

Ensayo de microcolonias de micobacterias en fibroblastos

Se empleó el ensayo de microcolonias en fibroblastos, anteriormente descrito⁵, con algunas modificaciones mínimas. Se prepararon monocapas de fibroblastos en placas de 6 × 4 pocillos descritas con anterioridad¹¹. Cuando las monocapas de fibroblastos fueron confluentes (a los 7 días), los pocillos se lavaron tres veces con el medio de Iscove y se añadió finalmente este mismo medio para un período de equilibrio de 24 h. Posteriormente, los pocillos se inocularon con varias concentraciones de las cepas (10⁴, 10³, 10² y 10 unidades formadoras de colonias). Después de una hora de incubación a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, las monocapas se lavaron tres veces con el medio de Iscove a 37 °C; se añadió 1 ml por pocillo de EMEM con agar a 50-52 °C, cubriendo la monocapa y se esperó a que se solidificase a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se incubaron en una estufa a 37 °C y en atmósfera de 5% de CO₂. Las colonias se examinaron visualmente, en intervalos diarios. El cuarto día de incubación se inspeccionó la morfología de las microcolonias, momento en el que se tomaron fotografías con el microscopio con el objetivo de 20 y de 10 aumentos. Las microcolonias se fijaron entonces añadiendo 2,0 ml de PBS 80%-formaldehído 20% a cada pocillo, durante 24 h, seguido de la eliminación del agar por aspiración. Posteriormente, se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen. Utilizando fotografías en color de 10 × 15 cm, se midió el diámetro de las microcolonias individuales en las dimensiones más larga y más corta con un calibre electrónico y, a continuación, se corrigió al tamaño real en milímetros.

Análisis estadístico

Las características cuantitativas del cultivo, tales como la longitud, la anchura y la relación entre éstas, obtenidas de los aislamientos no significativos, se compararon con las obtenidas de las cepas significativas y presuntamente virulentas utilizando la prueba de la t de Student. Previamente, la distribución normal de las medidas fue corroborada utilizando el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnoff. Para las características cualitativas, se empleó el test exacto de Fisher. Los mismos estudios se repitieron utilizando una clasificación dicotómica de especies, tanto en *M. peregrinum*-*M. fortuitum* como *M. chelonae*-*M. abscessus*-*M. mucogenicum*, como una variable de clasificación.

Con el fin de conocer si pudiera ser factible predecir la significación clínica de una cepa (y por ello su virulencia) a partir de las características de cultivables obtenidas en un cultivo celular, se construyó un modelo de regresión logística.

Resultados

Primero, se aplicó el modelo de microcolonias en las cepas de la colección, con el fin de evaluar la rapidez de la

TABLA 1. Características de las cepas incluidas en el estudio

Cepa	Especie	Significado clínico	Morfología ^c	Microcolonias ^d
DSMZ 44196	<i>M. abscessus</i>	NA ^a	L	Redondeadas
ATCC 35752	<i>M. chelonae</i>	NA ^a	L	Redondeadas
ATCC 6841	<i>M. fortuitum</i>	NA ^a	L	Redondeadas
ATCC 14467	<i>M. peregrinum</i>	NA ^a	L	Redondeadas
DSMZ 44124	<i>M. mucogenicum</i>	NA ^a	R	Redondeadas
ATCC 700731	<i>M. septicum</i>	NA ^a	L	Redondeadas
FJD5 A	<i>M. chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas	L	Redondeadas
FJD69	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas	R	Redondeadas
FJD85	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas	L	Redondeadas
FJD133	<i>M. abscessus</i>	Desconocido ^b	L	Redondeadas
FJD83	<i>M. chelonae</i>	No	L	Redondeadas
FJD64	<i>M. abscessus</i>	Infección de piel y partes blandas	L	Redondeadas
FJD95	<i>M. abscessus</i>	Desconocido ^b	L	Redondeadas
FJD191	<i>M. fortuitum</i>	No	L	Redondeadas
FJD193	<i>M. abscessus</i>	Osteomielitis	L	Redondeadas
FJD18	<i>M. mucogenicum</i>	No	L	Redondeadas
FJD51	<i>M. chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas	L	Redondeadas
FJD176	<i>M. chelonae</i>	Bacteriemia relacionada con catéter	L	Alargadas
FJD10	<i>M. peregrinum</i>	Infección urinaria	L	Redondeadas
FJD155	<i>M. mucogenicum</i>	No	R	Redondeadas
FJD26	<i>M. peregrinum</i>	No	R	Redondeadas
FJD48	<i>M. peregrinum</i>	No	L	Redondeadas
FJD53	<i>M. peregrinum</i>	No	R	Redondeadas
FJD206	<i>M. fortuitum</i>	No	R	Redondeadas
FJD25	<i>M. chelonae</i>	Bacteriemia relacionada con catéter	R	Alargadas
FJD24	<i>M. fortuitum</i>	Infección de piel y partes blandas	R	Redondeadas
FJD187	<i>M. mucogenicum</i>	No	L	Redondeadas
FJD82	<i>M. chelonae</i>	No	L	Redondeadas
FJD5	<i>M. chelonae</i>	Osteomielitis	L	Redondeadas

^aNo aplicable.^bCepas suministradas por el Centro Nacional de Microbiología. No hay datos clínicos disponibles.^cFenotipo de las colonias en Middlebrook/H11. R: rugosas; L: lisas.^dMorfología de las microcolonias en el cultivo en fibroblastos diploides humanos.

detección de las mismas. Con esta prueba, se detectó el crecimiento de *M. fortuitum* ATCC 6841 y *M. peregrinum* ATCC 14467 después de 24 h de incubación. Las microcolonias de *M. mucogenicum* DSMZ 44124 se detectaron después de 48 h, y las otras especies sólo se pudieron detectar después de 72 h de incubación. Todas las especies crecieron perfectamente y fueron claramente visibles tras 96 h de incubación, de manera que se seleccionaron estos tiempos para las lecturas en los siguientes experimentos.

En el siguiente experimento, los aislamientos clínicos se estudiaron junto con las cepas de colección. Las especies y su significado clínico se muestran en la tabla 1. Así, 11 cepas fueron consideradas como causa de infección humana, mientras que 10 se consideraron colonizadoras o contaminantes. Los aislamientos significativos fueron *M. abscessus* (2 cepas), *M. chelonae* (5 cepas), *M. fortuitum* (3 cepas) y *M. peregrinum* (1 cepa). Ninguna de las cepas de *M. mucogenicum* se consideró causa de infección en las series realizadas. La medida de las microcolonias oscilaba entre 0,0601 y 0,2044 mm de ancho, y 0,0808 y 0,3004 mm de longitud. Las colonias de *M. fortuitum* y *M. peregrinum* mostraron una forma redondeada con bordes desfleados, mientras que las colonias de otras especies tenían

más claramente definido el contorno (fig. 1). Si las especies de micobacterias fueran repartidas en dos grupos, de manera que el grupo de *M. fortuitum* incluyese las especies de *M. fortuitum* y *M. peregrinum*, y el grupo de *M. chelonae* incluyera a *M. chelonae*, *M. abscessus* y *M. mucogenicum*, las características del cultivo serían notablemente diferentes entre estos dos grupos. Sólo dos cepas de *M. chelonae*, ambas procedentes de hemocultivos, mostraron microcolonias con alargamiento, como se ha descrito previamente para las cepas con capacidad de invasión intracelular⁵, mientras que el resto de aislamientos mostraron colonias redondeadas, con diferentes tamaños y relaciones entre el ancho y la longitud de las mismas. Un análisis microscópico a 100 aumentos de las colonias alargadas mostró que los fibroblastos se encontraban invadidos por las micobacterias en la proximidad de las colonias, pero no en las otras cepas.

Se diseñó un modelo de regresión logística con el propósito de diferenciar las cepas patógenas de las no patógenas, empleando las variables categóricas y numéricas estudiadas anteriormente, pero éstas no mostraron utilidad, permitiéndonos predecir correctamente sólo el 62% de las cepas en el modelo.

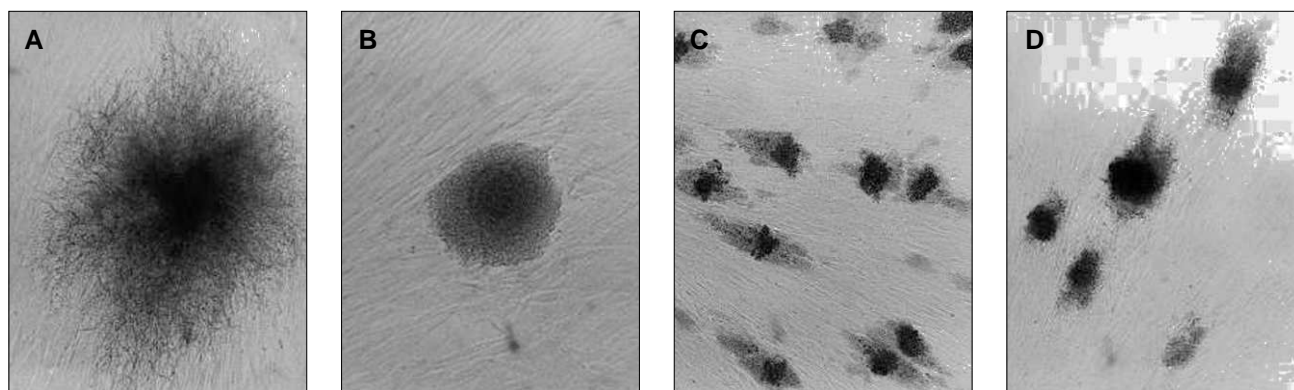


Figura 1. Apariencia microscópica de las microcolonias. A) Colonia desflecada característica del grupo *Mycobacterium fortuitum*. Cepa FJD24. B) Colonia redondeada característica del grupo *Mycobacterium chelonae*. Cepa FJD133. Aumento $\times 20$. C) Microcolonias alargadas, cepa FJD176. D) Microcolonias alargadas, cepa FJD25. Aumento $\times 10$.

Discusión

El papel de las micobacterias de crecimiento rápido como patógenos humanos ha sido reconocido desde hace décadas^{1,2,7,12}, y existe una amplia evidencia epidemiológica sobre el posible papel de diversos factores de riesgo en relación con la capacidad de estos organismos de producir patología en humanos. El hecho de que muchas infecciones humanas causadas por estas micobacterias estén asociadas con la presencia de cuerpos extraños, como catéteres, hilos de suturas o prótesis², por ejemplo, sugiere que la adherencia a estas superficies podría representar un papel esencial en el desarrollo de una enfermedad humana causada por micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. Sin embargo, existen muy pocos estudios *in vitro* dedicados a descubrir los mecanismos específicos de patogenicidad de estas bacterias. Uno de estos estudios describe la actividad hemolítica de estas especies y sugiere un potencial patógeno para estas enzimas⁴, aunque posteriormente no se han publicado nuevos artículos al respecto.

Por otro lado, la capacidad de penetración y de supervivencia intracelular de las micobacterias han sido ampliamente estudiados como factores de patogenicidad de las micobacterias, en especial *M. tuberculosis*. Para este fin, se han utilizado ampliamente diversos modelos de cultivos celulares¹³. Entre éstos, en algunos casos se ha descrito el crecimiento de diversas especies de micobacterias en líneas celulares empleadas para el cultivo viral a partir de muestras clínicas^{14,15}, mientras que otros son modelos *in vitro* diseñados específicamente para estudiar diferentes aspectos de las enfermedades y evaluar su posible tratamiento^{3,5,11,16-30}. Entre estos últimos, dos de ellos describen la utilidad de un modelo de evaluación de la morfología de las microcolonias obtenidas tras crecimiento de la micobacteria en monocapa de fibroblastos diploides humanos para determinar el potencial patógeno de *M. tuberculosis*¹¹ y *M. abscessus*⁵. Estos estudios demostraron que, en ambos casos, la presencia de microcolonias alargadas se asociaba con un mayor potencial patógeno de las cepas debido a que dicha morfología evidenciaba la capacidad de la bacteria para la invasión de las células, mientras que las cepas con menor poder patógeno daban lugar a colonias redondeadas. En el trabajo desarrollado con dos cepas de *M. abscessus*, los autores describen, así mismo, como

característica de las cepas patógenas la presencia de un fenotipo de colonias rugosas en medio de cultivo convencional con base de agar, mientras que la cepa que presentaba un fenotipo de colonias lisas no mostraba potencial patógeno. En ambos casos, dicho potencial se evaluó específicamente para ambas cepas en un modelo experimental de infección en animales⁵. Nuestro estudio ha intentado, en primer lugar, evaluar la presencia de un fenotipo de colonia de morfología rugosa o lisa en relación con el significado clínico de la cepa aislada tras realizar una revisión exhaustiva de la historia clínica del paciente. En nuestro caso, tanto las colonias rugosas como las lisas aparecieron en los grupos de micobacterias tanto significativos como no significativos, por lo que dicha característica no parece asociarse con la capacidad de producir infección en humanos. Así mismo, se estudió posteriormente la capacidad de invasión intracelular en relación con el significado clínico de los aislamientos anteriormente citados. Entre las cepas que mostraron microcolonias alargadas en el modelo de fibroblastos, una de ellas mostró el fenotipo de colonias rugosas, pero la otra tuvo una colonia lisa, por lo que parece que el fenotipo de colonia no es una cualidad que pueda asociarse con el potencial invasivo de las cepas. Curiosamente, ambas cepas se aislaron en hemocultivos de 2 casos de bacteriemia, y representan las dos infecciones más graves en nuestra serie, por lo que podría especularse que la capacidad de invasión intracelular estaría relacionada con cuadros de infección especialmente graves. Sin embargo, a pesar del pequeño número de cepas estudiadas, la mayoría de las cepas clínicamente significativas no presentaban microcolonias alargadas, por lo que esta característica no parece estar directamente relacionada con la capacidad de producir infección en humanos.

En conclusión, de acuerdo con nuestros resultados, ni el fenotipo de la colonia en medio Middlebrook 7H11 ni la capacidad de penetración intracelular estudiada mediante la morfología de las microcolonias en un modelo de cultivo en monocapa de fibroblastos se asocian significativamente con la capacidad de producir infección en humanos, estudiada mediante un exhaustivo análisis de las historias clínicas de los pacientes. En el futuro deberían desarrollarse otros estudios para confirmar nuestros datos, debido al pequeño número de cepas estudiado, y para establecer la presencia de los diferentes determinantes de

patogenicidad en estas especies y la relación de éstos con la capacidad de producir infección humana.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado mediante una beca FIS PI: 030146. Nieves Zamora es beneficiaria de una beca predoctoral de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

Bibliografía

1. Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2002;15:716-46.
2. Wallace RJ, Brown BA. *Mycobacterium fortuitum*, *chelonae*, *abscessus*. En: Schlossberg D, editor. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p. 372-9.
3. Shepard CC. Growth characteristics in HeLa cells of the rapidly growing acid fast bacteria, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. 1957;73:722-6.
4. Udou T. Extracellular hemolytic activity in rapidly growing mycobacteria. Can J Microbiol. 1994;40:318-21.
5. Byrd TF, Lyons CR. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. Infect Immun. 1999;67:4700-7.
6. Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. Protocolo 9.^a En: Cercenado E, Cantón R, editores. Alcaide F, coordinador. Procedimientos en Microbiología Clínica. Madrid: SEIMC. 2005.
7. Wallace RJ, Cook JL, Glassroth J, Griffith DE, Olivier KN, Gordin F. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. American Thoracic Society Statement. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:S1-S25.
8. Escalonilla P, Esteban J, Soriano ML, Farina MC, Pique E, Grilli R, et al. Cutaneous manifestations of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Exp Dermatol. 1998;23:214-21.
9. Esteban J, Martín Moreno L, Valero Moratalla ML, Espinel Vázquez ML. Lesiones cutáneas nodulares en paciente sometida a hemodiálisis crónica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1993;11:391-2.
10. Esteban J, Gutiérrez F, Fariña MC, Martín Moreno L, Requena L, Jiménez Arriero M, et al. Significado clínico de los aislamientos de micobacterias de crecimiento rápido. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1997;15:260-3.
11. Byrd TF, Green GM, Fowlston SE, Lyons CR. Differential growth characteristics and streptomycin susceptibility of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in a novel fibroblast-mycobacterium microcolony assay. Infect Immun. 1998;66:5132-9.
12. Howard ST, Byrd TF. The rapidly growing mycobacterias: saprophytes and parasites. Microb Infect. 2000;2:1845-53.
13. Orme IM, Roberts AD, Furney SK, Skinner PS. Animal and cell-culture models for the study of mycobacterial infections and treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994;13:994-9.
14. Gadea I, Zapardiel J, Ruiz P, Gegúndez MI, Esteban J, Soriano F. Cytopathic effect mimicking virus culture due to *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1993;31:2517-8.
15. Buehring GC, Valesco M, Pan CY. Cell culture contamination by mycobacteria. In vitro cellular and developmental biology. Animal. 1995;31:735-7.
16. Bermúdez LE. Infection of "nonprofessional phagocytes" with *Mycobacterium avium* complex. Clin Immunol Immunopathol. 1991;61:225-35.
17. Bermúdez LE, Young LS. Factors affecting invasion of HT-29 and HEP-2 epithelial cells by organisms of the *Mycobacterium avium* complex. Infect Immun. 1994;62:2021-6.
18. Bermúdez LE, Shelton K, Young LS. Comparison of the ability of *Mycobacterium avium*, *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* to invade and replicate within HEP-2 epithelial cells. Tuberc Lung Dis. 1995;76:240-7.
19. Fattorini L, Baldassarri L, Li YJ, Ammendolia MG, Fan Y, Recchia S, et al. Virulence and drug susceptibility of *Mycobacterium celatum*. Microbiology. 2000;146:2733-42.
20. Higuchi K, Harada N, Yamada H, Kobayashi K, Takeda M. The invasion of *Mycobacterium tuberculosis* into non-phagocytic cells. Kekkaku. 2000;75:649-59.
21. Kang BY, Chung SW, Lim YS, Kim EJ, Kim SH, Hwang SY, et al. Interleukin-12-secreting fibroblasts are more efficient than free recombinant interleukin-12 in inducing the persistent resistance to *Mycobacterium avium* complex infection. Immunology. 1999;97:474-80.
22. Kheifets LB, Staroverova IS. [Determination of intracellular activity of *Mycobacterium tuberculosis* in cell culture]. Probl Tuberk. 1974;0:79-83.
23. Kim KD, Lee HG, Kim JK, Park SN, Choe IS, Choe YK, et al. Enhanced antigen-presenting activity and tumour necrosis factor-alpha-independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Immunology. 1999;97:626-33.
24. Madhavan HN, Sharma KB. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* on HeLa cell culture. Ind J Med Res. 1970;58:1560-2.
25. Matsuo Y. Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in mouse foot-pad cell culture. Jap J Microbiol. 1970;14:233-40.
26. Matsuo Y. Cultivation of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* in cell culture. Kitasato Arch Exp Med. 1976;49:135-40.
27. Matsuo Y, Tatsukawa H. Attempts at cultivation of *Mycobacterium leprae* in cell culture under regulation of redox potential at environment. Hiroshima J Med Sci. 1982;31:141-3.
28. Ramakrishnan L, Falkow S. *Mycobacterium marinum* persists in cultured mammalian cells in a temperature-restricted fashion. Infect Immun. 1994;62:3222-9.
29. Reddy VM, Kumar B. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. J Infect Dis. 2000;181:1189-93.
30. Sangari FJ, Petrofsky M, Bermúdez LE. *Mycobacterium avium* infection of epithelial cells results in inhibition or delay in the release of interleukin-8 and RANTES. Infect Immun. 1999;67:5069-75.