

Mycobacterium chelonae

Antonio Ramírez Rosales

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca

Mycobacterium chelonae es una especie perteneciente al grupo de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MCR) incluidas en el grupo IV de Runyon. Sus primeras descripciones se remontan a 1953 en el *Bergey's Manual* como una micobacteria con características algo diferentes a *Mycobacterium fortuitum*. En adelante, se incluyó dentro del complejo *M. fortuitum*. Hasta hace una década se ha mantenido una clasificación de este grupo en donde *Mycobacterium abscessus* ha sido considerada una subespecie de *M. chelonae*. En 1992 Kusunoki *et al.*, basándose en estudios taxonómicos y de hibridación de DNA realizados entre las especies y subespecies del complejo *M. fortuitum*, propusieron la separación de *M. chelonae* y *M. abscessus* en dos especies bien diferenciadas. Más recientemente, se ha descrito una nueva especie, *Mycobacterium mucogenicum* anteriormente conocida como “*M. chelonae-like*”, estableciéndose una nueva reclasificación de las micobacterias del complejo *M. fortuitum* (o complejo *M. fortuitum-chelonae*) en seis especies: *M. fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *M. fortuitum* tercera biovariedad, *M. chelonae*, *M. abscessus* y *M. mucogenicum*.

En la actualidad, *M. chelonae* puede diferenciarse claramente por métodos fenotípicos, genéticos y cromatográficos de las otras especies que forman el complejo *M. fortuitum*, así como del resto de las MCR. *Mycobacterium chelonae* es una micobacteria ubicua y de distribución universal, ya que se han descrito aislamientos en humanos, animales y fuentes de origen ambiental, en prácticamente todos los continentes. Se ha recuperado del suelo y, fundamentalmente, del agua. Su relativa resistencia a la cloración ha permitido aislarla en el agua de la red hospitalaria. También se ha aislado de algunos desinfectantes comunes en el hospital, como el violeta de genciana.

En el laboratorio la identificación de especie es importante, ya que existen más de 40 MCR, la mayoría de escasa patogenicidad. Por el contrario, las especies englobadas en el grupo *M. fortuitum* están consideradas patógenos humanos oportunistas. Por otro lado, es clínicamente importante identificar correctamente estos microorganismos ya que pueden requerir regímenes terapéuticos distintos. Además, existe una gran variabilidad en la tasa de resistencias para algunos antimicrobianos entre diferentes cepas de *M. chelonae* o *M. abscessus*. Por último, se ha descrito el desarrollo de la resistencia a ciertos antibióticos (amikacina, claritromicina) en el transcurso de algunos tratamientos. Todo ello ha impulsado el desarrollo de técnicas de estudio de sensibilidad antibiótica que puedan ser aplicadas en este grupo de microorganismos. Recientemente se ha reactualizado el interés por *M. chelonae* y *M. abscessus* por su capacidad de desarrollar epidemias y pseudoepidemias nosocomiales y de la comunidad, vehiculizadas sobre todo por los desinfectantes, material o equipamiento hospitalario contaminados por estas micobacterias.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

Se han descrito numerosas formas clínicas que varían en la gravedad y que abarcan desde las infecciones más frecuentes, de piel y tejidos blandos, hasta la infección diseminada y potencialmente fatal. La descripción etiológica en muchos estudios de estos procesos como *M. chelonae-abscessus*, previa a su separación taxonómica en diferentes especies, hace que resulte difícil definir matices diferenciales en los cuadros o manifestaciones clínicas entre ambas especies si bien, en general, se considera que *M. abscessus* es más patógena y el proceso infeccioso que produce cursa con mayor respuesta inflamatoria que *M. chelonae*. Las infecciones en humanos producidas por *M. chelonae* se pueden agrupar en:

- **Infecciones localizadas.** Las infecciones de piel y tejidos blandos constituyen la patología más frecuente de *M. chelonae*. Estas infecciones pueden ser de origen traumático (pinchazos, laceraciones de piel, etc.), o de una herida quirúrgica. Es clásica la descripción de la osteomielitis asociada a la cirugía de larga duración (cirugía cardíaca con esternotomía) que se ha observado más frecuentemente en *M. fortuitum*. Una entidad bien conocida es la queratitis por *M. chelonae* postraumática o secundaria a la cirugía corneal (queratotomía) de curso tórpido, subagudo, difícil de diagnosticar si no se tiene una alta sospecha, y que, a pesar de tratamiento antimicrobiano y quirúrgico, tiene mal pronóstico. Otras infecciones descritas son la otitis media, artritis, tenosinovitis, etc.
- **Infección pulmonar.** *M. chelonae*, al igual que las otras micobacterias del grupo *M. fortuitum* puede causar infección respiratoria de características más o menos similares a *Mycobacterium tuberculosis*. Esta micobacteria se considera un patógeno probable y de tipo oportunista, por lo que, para su valoración clínica, se han de tener en cuenta los diferentes criterios de patogenicidad que se han señalado para las micobacterias no tuberculosas como son: aislamiento de la micobacteria en varias muestras de esputo, cultivo abundante, cuadro clínico compatible, signos anatomopatológicos de infección compatible con micobacteriosis (infiltrado granulomatoso, a veces con la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes) y ausencia de *M. tuberculosis* (criterio relativo de exclusión patógena en las MCR). *Mycobacterium chelonae* se ha asociado también con infección pulmonar en enfermos con fibrosis quística.
- **Infección diseminada.** La infección diseminada por *M. chelonae* suele manifestarse principalmente por la presencia de abscesos cutáneos e infección visceral. En algunos casos se ha descrito como una fiebre de origen desconocido sin manifestaciones cutáneas ni otra focalidad clínicamente aparente, si bien puede haber evidencia de afectación de la médula ósea. La mayoría de los enfermos tienen una enfermedad de base predisponente a la infección y, en su defecto, debe de buscarse, ya que se ha descrito la infección diseminada por *M. chelonae* en enfermos previamente sanos que meses después han desarrollado un proceso maligno. En los inmunocompetentes la infección diseminada se ha manifestado como una linfadenopatía crónica. En todos los casos, sin embargo, hay que señalar que una infección diseminada por *M. chelonae* o *M. abscessus* sin afectación cutánea es infrecuente. De estas manifestaciones cutáneas destacan: la pustulosis generalizada, el eritema nodoso, a veces con una erupción maculopapular eritematosa difusa que afecta generalmente a ambas extremidades inferiores. Las biposias de la piel suelen poner de manifiesto la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. Se ha descrito la participación de *M. chelonae* en otro tipo de infecciones sistémicas (meningitis, artritis, peritonitis, endocarditis, etc.).

Estos microorganismos se han relacionado con casos de infección nosocomial, lo que se ha atribuido con más frecuencia a *M. abscessus* que a *M. chelonae*. El desarrollo reciente de técnicas de tipificación molecular ha permitido describir la aparición de brotes de infección nosocomial por estas micobacterias que pueden contaminar desinfectantes, agua de diálisis, prótesis, catéteres vasculares y otros dispositivos hospitalarios. *Mycobacterium chelonae*, como patógeno oportunista, se asocia frecuentemente a enfermedades de base debilitantes presentes sobre todo, como se ha dicho, en la infección diseminada. Se han descrito infecciones en pacientes sometidos a corticoterapia crónica, inmunodepresión, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, neoplasias, discrasias sanguíneas, etc. Además, se han comunicado casos en trasplantados de médula ósea y de órgano sólido (riñón, pulmón, hígado, etc.).

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

En el examen microscópico, estas bacterias aparecen como bacilos ácido alcohol resistentes directamente en la muestra. Hay que puntualizar que, algunas cepas, presentan una débil afinidad con los fluorocromos, de tal forma que pueden no teñirse adecuadamente con Auramina O, por lo que se debe realizar siempre una tinción de Zielh- Neelsen adicional ante la sospecha de *M. chelonae* u otros miembros de este grupo.

Mycobacterium chelonae crece en los medios habituales de micobacterias (Löwenstein-Jensen o agar Middlebrook) en 3-7 días como una colonia no pigmentada. Se detecta a las 24-48 h de la siembra en los medios de cultivo líquidos que actualmente se recomiendan para el cultivo primario de micobacterias, como son el Bactec[®] 460 TB, Bactec[®] MGIT 960, MB/BacT[®] o el ESP II[®]. Suele crecer también en los medios bacteriológicos habituales, como el agar sangre. Su temperatura de crecimiento idónea es a 28-30 °C, si bien es recomendable la incubación del cultivo a 37°C, 30°C y 45°C para la posible recuperación de *M. tuberculosis* y otras micobacterias no tuberculosas que puedan estar presentes en lesiones cutáneas, biopsias viscerales, ganglios o abscesos en cuya etiología pueda estar involucrada una micobacteria.

Identificación

La identificación puede realizarse por diferentes métodos: mediante pruebas bioquímica, por cromatografía o, más recientemente, por técnicas moleculares. Así, se han descrito numerosas pruebas bioquímicas para la separación e identificación de las MCR, aunque se puede alcanzar la identificación de *M. chelonae* siguiendo un esquema simplificado (figura 1). La velocidad de crecimiento y la ausencia de pigmento selecciona el grupo de las MCR no pigmentadas. De entre todas ellas, interesa discriminar el complejo patógeno *M. fortuitum*, que puede realizarse mediante las pruebas de crecimiento en agar McConkey sin cristal violeta y la prueba aril-sulfatasa, que es positiva a los tres días. *Mycobacterium chelonae*, *M. abscessus* y *M. mucogenicum* se diferencian de *M. fortuitum* por la ausencia de la enzima nitratorreductasa, y por su incapacidad de asimilar hierro a partir de un medio con citrato férrico amoniacal. Hay que puntualizar que algunas cepas de *M. mucogenicum* pueden dar alguna de las dos pruebas anteriores débilmente positivas reflejando cierta heterogeneidad en esta nueva especie. Finalmente, *M. chelonae* puede diferenciarse de *M. abscessus* mediante dos pruebas: la ausencia de crecimiento en medio con NaCl al 5% y la utilización de citrato sodico. En la tabla 1 se presentan las pruebas fenotípicas más características para la identificación de *M. chelonae*.

Tabla 1. Diferenciación de *M. chelonae* de las otras especies del complejo^a.

	Nitratos	Citrato ferrico amoniacal	NaCl al 5%	Utilización de		
				Citrato	Manitol	Inositol
<i>M fortuitum</i>	+	+	+	-	-	-
<i>M. peregrinum</i>	+	+	+	-	+	-
<i>M. fortuitum</i> , biovariedad III	+	+	+	-	+	+
<i>M. abscessus</i>	-	-	+	-	-	-
<i>M chelonae</i>	-	-	-	+	-	-
<i>M. mucogenicum</i>	-	-	-	+	+	-

^aLas seis especies del complejo *M. fortuitum-chelonae* dan la prueba de la aril sulfatasa (+) en 3 días y crecen en agar McConkey sin cristal violeta.

Algunos laboratorios disponen de técnicas cromatográficas (capa fina, cromatografía líquida de alta presión) que pueden ser útiles para identificar esta micobacteria. Para ello se analizan los perfiles de los diferentes ácidos micólicos presentes en la pared de la micobacteria, lo que permite identificar y separar claramente *M. chelonae* y *M. abscessus*.

En la actualidad, cobran especial relevancia las técnicas moleculares. De entre ellas, el método PRA (*PCR-RFLP Analysis*), que analiza el gen *hsp65*, ha sido ampliamente usado en la identificación de la mayoría de micobacterias clínicamente relevantes y en la separación taxonómica rápida de las MCR. Mediante los cebadores *TB11* y *TB12* se obtiene un producto de amplificación de 439 pb. Este amplificado es digerido con las enzimas *HaeIII* y *BstEII*, y los productos de restricción, separados por electroforesis, son teñidos y fotografiados. Se obtienen así unos patrones de bandas, cuyo tamaño y composición pueden integrarse en una base de datos. Esta técnica permite identificar y separar correctamente especies de *M. chelonae* y *M. abscessus* en 4-5 horas a partir de pocas colonias crecidas en medios sólidos o de cultivos líquidos. Un posible inconveniente de esta técnica puede ser la variabilidad genética de algunas cepas, que puede resultar en patrones de bandas desconocidos o no publicados anteriormente.

Otros métodos moleculares de identificación, como la amplificación de fragmentos específicos de especie o la secuenciación, resultan, por el momento, poco útiles en la mayoría de laboratorios diagnósticos. Recientemente, se ha incorporado en la identificación de micobacterias no tuberculosas una técnica comercial INNO-LiPA® (*Line Probe Assay*) que consiste en la realización de una PCR sobre un fragmento específico de género. Los productos de amplificación generados se someten a una hibridación sobre una membrana en la que están colocadas paralelamente sondas específicas de algunas micobacterias. Se disponen tres bandas que corresponden a sondas de varios genotipos de *M. chelonae*. Las primeras evaluaciones del método demuestran que el método es capaz de identificar correctamente el complejo *M. chelonae-abscessus*. Sin embargo, y a pesar de los genotipos incluidos de *M. chelonae*, no discrimina entre esta especie y *M. abscessus*. Salvando estos problemas, la técnica es simple y fácil de incorporar en cualquier laboratorio.

Epidemiología molecular

La contaminación de desinfectantes, fibroscopios, catéteres, agua de diálisis, etc. por MCR, y la aparición subsiguiente de brotes de infección nosocomial por *M. chelonae*, y más frecuentemente por *M. abscessus*, ha relanzado el interés por el estudio molecular de estas cepas. De las diferentes técnicas de epidemiología molecular, se han utilizado con éxito en el estudio de *M. chelonae* y *M. abscessus* los patrones electroforéticos de enzimas [*MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis)*] y la electroforesis de campos pulsantes (PFGE). Así, recientemente, el empleo de las dos técnicas permitió detectar y confirmar el origen común de un brote de abscesos cutáneos por *M. abscessus* secundarios a la inoculación de un producto no controlado que afectó a 87 personas. Es de señalar que se trató de un brote comunitario que afectó a varios estados de los Estados Unidos, y con una duración de 18 meses desde la aparición del primer caso hasta la confirmación de la existencia y origen del brote.

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

En las cepas clínicamente importantes de MCR, los argumentos a favor de la realización de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos son: a) los diferentes patrones de sensibilidad observados entre *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*, b) la expresión variable de la sensibilidad entre cepas de una determinada especie (*M. chelonae*), c) la constatación de la adquisición de resistencia durante un tratamiento (amikacina, claritromicina, por ejemplo), y d) el éxito en el tratamiento de algunos casos guiados por los resultados de las pruebas de sensibilidad. Sin embargo, no existe un método uniformemente aceptado, debido a la dificultad en la estandarización de las técnicas, a la falta de reproducibilidad entre laboratorios y a la poca concordancia de algunos antimicrobianos entre los datos de *in vitro* y la respuesta terapéutica. A pesar de las dificultades mencionadas, se han desarrollado diferentes técnicas para el antibiograma de estas micobacterias, como son el método de difusión en agar con discos, la técnica de

elución de discos en agar, o la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por dilución en agar.

El método recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para el antibiograma de *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* en el documento más reciente, del año 2000, es la microdilución en caldo con diluciones seriadas a las concentraciones y antimicrobianos relacionado en la tabla 2. Se recomienda preparar una suspensión de la micobacteria a una concentración equivalente al patrón 0,5 de McFarland, alcanzando un inóculo final en el pocillo del antibiótico de 5×10^5 ufc/ml. Se incuba el panel a 30 °C y se realiza la lectura a las 72 h. Si no hay suficiente crecimiento, se realizará la lectura diariamente hasta los 5 días.

Tabla 2. Antimicrobianos intervalo de concentraciones y criterios de interpretación del NCCLS^a para la técnica de microdilución en las MCR.

Antimicrobiano	Intervalo recomendado (µg /ml)	CMI (µg /ml)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Claritromicina	0,03-64	≥2	4	≥8
Imipenem	1-64	≥4	8	≥16
Cefoxitina	2-256	≤16	32-64	≥128
Amikacina	1-128	≤16	32	≥64
Sulfametoxazol	1-64	≥32		≥64
Doxiciclina	0,25-32	≥4	2-8	≥16
Tobramicina	1-16	≥4	8	≥16
Ciprofloxacino	0,125-16	≥4	2	≥4

^aNational Committee for Clinical Laboratory Standards. Documento M24-T2, 2000

En 1999 Woods *et al.* expusieron ciertas consideraciones a tener en cuenta en la interpretación del antibiograma para las MCR del complejo *M. fortuitum*:

- En *M. chelonae* se recomienda añadir la tobramicina, debido a que tiene mejor margen terapéutico que la amikacina. Una CMI a la tobramicina $>4 \mu\text{g/ml}$ en *M. chelonae* es infrecuente y debe ser reconfirmada, por ejemplo en un laboratorio de referencia.
- La CMI al sulfametoxazol es difícil de establecer, ya que se propone considerar sólo el 80% de inhibición de crecimiento. No obstante, se ha observado que, prácticamente, todas las cepas de *M. chelonae* y *M. abscessus* son virtualmente resistentes, con CMI $>64 \mu\text{g/ml}$.
- La claritromicina. y el ciprofloxacino puede presentar un fenómeno de *training* que dificulta establecer el punto final de la CMI.
- Con el imipenem se ha comprobado que existe poca reproducibilidad interlaboratorio. Aunque las razones son desconocidas, algunos autores lo atribuyen a la inestabilidad del fármaco. Se recomienda, de forma estricta, realizar la lectura a los 3 días de incubación. *Mycobacterium fortuitum* suele estar bien crecido a los 3 días, pero la velocidad de crecimiento de *M. chelonae* o *M. abscessus* es más inconstante, de forma que no es posible realizar la lectura antes de los 4-5 días. En esos casos, un crecimiento tardío puede reflejar una falsa resistencia, por lo que se recomienda no informar la sensibilidad al imipenem.

En estudios de sensibilidad realizados por la técnica de microdilución se ha observado que prácticamente todas las cepas de *M. chelonae* procedentes de Estados Unidos son sensibles a la tobramicina, mientras que *M. abscessus* se muestra más sensible

a la amikacina. La sensibilidad al imipenem varía del 40-60% entre las cepas de *M. chelonae*. Para la cefoxitina y *M. chelonae* se citan porcentajes muy variables de sensibilidad, entre el 0-90%. Más del 95% de las cepas de *M. chelonae* son sensibles a la claritromicina.

Las dificultades en la preparación de los paneles de microdilución, incluso utilizando paneles comerciales, generan problemas de reproducibilidad entre laboratorios. Por esa razón se han buscado técnicas más simples de realizar que obvian, en parte, los problemas asociados con el método de microdilución. El sistema E-test[®] se ha introducido hace unos años como técnica de antibiograma para las MCR. Los primeros estudios presentan resultados prometedores pero, sin embargo, se requiere de mayor experiencia acumulada, de la que carecemos por el momento, antes de su recomendación como método alternativo.

Por lo que se refiere al tratamiento, *M. chelonae* y *M. abscessus* son habitualmente resistentes a los fármacos antituberculosos. En las infecciones localizadas suele asociarse al tratamiento quirúrgico, si es posible, un antimicrobiano eficaz (claritromicina). En las infecciones diseminadas se recomiendan las asociaciones de claritromicina y amikacina, claritromicina y tobramicina, o amikacina e imipenem. Como se ha dicho, el interés microbiológico en alcanzar la identificación de especie en las micobacterias del complejo *M. fortuitum* reside en el manejo terapéutico diferencial entre *M. fortuitum*, *M. chelonae* o *M. abscessus*. Continúan haciéndose esfuerzos en la estandarización del método de antibiograma más adecuado para las MCR. Por otra parte, el desarrollo de técnicas de epidemiología molecular en la caracterización de cepas está permitiendo detectar brotes de infección nosocomial o comunitario por MCR que ha sido transmitidas fundamentalmente por agua de red, desinfectantes, medicamentos e instrumentos de uso sanitario contaminados.

BIBLIOGRAFÍA

- ANÓNIMO. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2000. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes. Tentative standard M24-T2 (2^a ed). Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
- BROWN BA, SWENSON JM, WALLACE RJ. Broth microdilution MIC test for rapidly growing mycobacteria. En: Isenberg HD (ed.). Clinical microbiology procedures handbook. Washington: American Society for Microbiology, 1992; pp 5.11.1-5.11.10.
- ESTEBAN J, FERNÁNDEZ ROBLAS R, SORIANO F. Rapidly growing mycobacteria in human pathology. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000;18:279-286.
- FALKINHAM JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996; 9:177-215.
- GALIL K, MILLER LA, YAKRUS MA, *et al.* Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. Emerg Infect Dis 1999; 5:681-687.
- GRIFFITH DE, GIRARD WM, WALLACE RJ. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. Am Rev Respir Dis 1993; 147:1271-1278.
- KUSUNOKI S, EZAKI T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica *et al.*) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1992; 42:240-245.

- PATEL R, ROBERTS GD, KEATING MR, PAYÁ CV. Infections due to nontuberculous mycobacteria in kidney, heart, and liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1994; 19:263-273.
- STEINGRUBE VA, GIBSON JL, BROWN BA, *et al.* PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995; 33:149-153.
- SUFFYS PN, DA SILVA ROCHA A, DE OLIVEIRA M, *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4477-4482.
- VEMULAPALLI RK, CANTEY JR, STEED LL, KNAPP TL, THIELMAN NM. Emergence of resistance to clarithromycin during treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection: case report and literature review. *J Infect Dis* 2001; 43:163-168.
- WALLACE RJ. Recent changes in taxonomy and disease manifestations of the rapidly growing mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 953-960.
- WOODS GL, BERGMANN JS, WITEBSKY FG, *et al.* Multisite reproducibility of E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:656-661.
- Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, *et al.* Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1676-1682.
- YAKRUS MA, HERNÁNDEZ SM, FLOYD MM, SIKES D, BUTLER WR, METCHOCK B. Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4103-10.

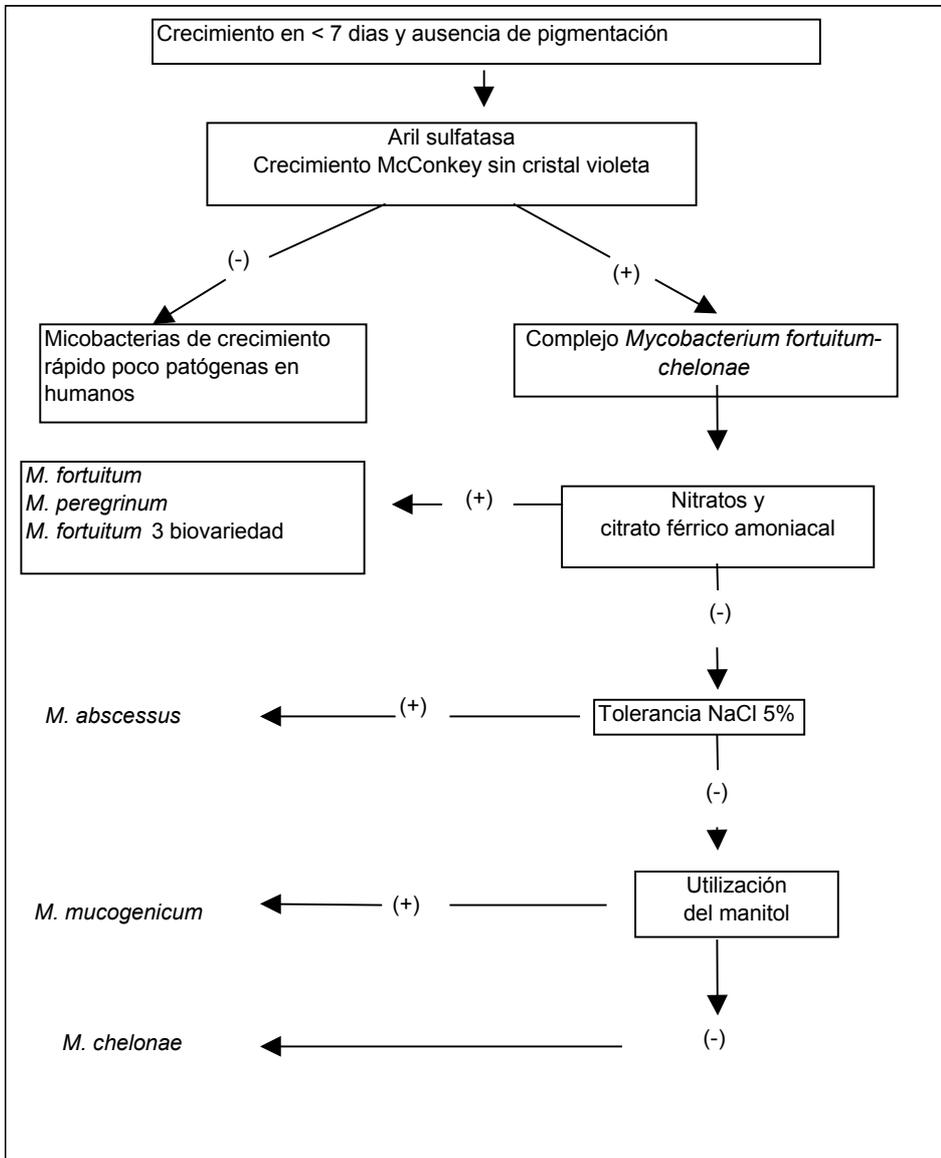


Figura 1. Esquema para la identificación de *M. chelonae* y especies relacionadas.