

# ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR *Mycobacterium kansasii*

Fernando Alcaide, Miguel Angel Benítez  
Servicio de Microbiología. Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge

Las micobacterias no tuberculosas representan, en la actualidad, entre el 10% y el 30% del total de las micobacterias aisladas en la mayoría de los laboratorios de microbiología. *Mycobacterium kansasii* es una de las especies más importantes de este grupo siendo, en muchas áreas del mundo, la segunda micobacteria más frecuente. En nuestro laboratorio ha representado, en los últimos años, entre el 25% y el 30% de todas las micobacterias no tuberculosas, incrementándose hasta el 50% en el último año. La experiencia de la literatura refleja que, en torno al 80% de los aislamientos de *M. kansasii*, son clínicamente significativos. A diferencia de otras especies de micobacterias no tuberculosas, esta elevada patogenicidad se observa tanto en la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como en la que no lo está.

En los pacientes inmunocompetentes, la enfermedad pulmonar representa el cuadro clínico más habitual. Suele tratarse de una enfermedad crónica, progresiva, cavitaria y, a veces, mortal. Afecta preferentemente a los lóbulos superiores y se asemeja, clínica y radiológicamente, a una tuberculosis pulmonar, aunque con signos y síntomas algo menos pronunciados. Se produce sobre todo en los pacientes fumadores, bronquíticos crónicos, o con alguna otra patología de base (cirróticos, diabéticos, gastrectomizados, etc.).

Las infecciones extrapulmonares por *M. kansasii* son menos frecuentes. La afectación de la piel y de los tejidos blandos puede simular una infección por *Mycobacterium marinum*. Se han descrito casos de linfadenitis cervical, afectación del sistema músculo-esquelético, pericarditis e infecciones genitourinarias. La enfermedad diseminada por *M. kansasii* suele producirse en los pacientes con un deterioro grave de la inmunidad celular (tricoleucemia, tumoraciones malignas, trasplantes de médula ósea o de órgano sólido, etc.) y, especialmente, en los pacientes con sida.

## EPIDEMIOLOGÍA

Los índices de infección anual en la población general oscilan entre 0,5 y 1 caso por cada 100.000 habitantes, aunque existe una importante variabilidad geográfica. Mientras que en ciertas áreas del mundo (Australia, Japón, sur de California y Virginia, en los EEUU) constituye un aislamiento raro, en regiones como Luisiana en los EEUU y norte de Moravia en la República Checa tienen un índice anual del 2,4 y 17,6 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. En España, en ciertas áreas del País Vasco, Madrid y Cataluña, *M. kansasii* constituye un aislamiento frecuente con tasas anuales de 2-3 casos/100.000 habitantes, mientras que en otras zonas geográficas, como Canarias, son una especie prácticamente inexistente.

Con la aparición de la epidemia del sida, se produjo un incremento de la infección por *M. kansasii*, con una incidencia anual de hasta 900 veces mayor en estos pacientes respecto a la población general. Sin embargo, la aparición de los nuevos tratamientos triples con inhibidores de la proteasa del VIH ha contribuido a un descenso notable de estos aislamientos, aunque no tan espectacular como en el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* cuyo aislamiento es ahora algo muy ocasional.

Hasta la actualidad, no se ha demostrado la transmisión interhumana, y el reservorio natural de *M. kansasii* es aún desconocido. Se ha postulado que el agua sería el hábitat natural más probable, ya que ha sido aislado en ocasiones de los grifos, duchas y depósitos de agua potable, aunque es excepcional su aislamiento en el agua de los ríos o de los lagos, así como en muestras de animales o del suelo. No obstante, a diferencia de otras micobacterias no tuberculosas, como *Mycobacterium xenopi*, no se han descrito brotes nosocomiales de *M. kansasii* por contaminación del agua de abastecimiento hospitalario. Esta circunstancia podría explicarse por la escasa resistencia al calor de *M. kansasii* respecto a otras micobacterias no tuberculosas de hábitat acuático. Por lo tanto, la asociación epidemiológica entre el posible reservorio natural y el ser humano, así como la vía y los mecanismos de transmisión están aún por dilucidar. Sin embargo, las descripciones recientes de la heterogeneidad de *M. kansasii* y la clonalidad observada en la subespecie más frecuente en el ser humano (tipo I), ayudará al esclarecimiento de estos aspectos mediante la realización de futuros estudios epidemiológicos, patogénicos y clínicos bien diseñados.

## TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO

### Examen microscópico

La observación del microorganismo en las diversas muestras clínicas constituye el método más sencillo, rápido y económico para el diagnóstico microbiológico. Se utilizan técnicas de tinción, que ponen de manifiesto la característica ácido-alcohol resistencia de las micobacterias, como la clásica de Ziehl-Neelsen o la variante fluorescente con auramina-rodamina. *M. kansasii* se observa como un bacilo grueso y largo, con una tinción irregular que le da un aspecto atigrado.

En general, el examen microscópico tiene una sensibilidad inferior al cultivo y está condicionada por el tipo de muestra clínica (las muestras de origen respiratorio son las de mayor rentabilidad) y por el tipo de tinción realizado (la tinción de auramina es algo más sensible que la de Ziehl-Neelsen). Es sabido que las micobacterias no tuberculosas se detectan con menor frecuencia, y con mayor dificultad, que *M. tuberculosis*, que oscila entre un 20% y un 80% de los cultivos positivos. Sin embargo, *M. kansasii* es la micobacteria no tuberculosa que mejor y con mayor frecuencia se observa en las tinciones.

Aunque la especificidad del examen directo de la muestra es muy elevada para la identificación de género, *M. kansasii*, como las demás especies micobacterianas, no puede ni debe ser diferenciada mediante la observación microscópica directa. Los resultados falsamente positivos (tinción positiva de bacilos ácido-alcohol resistentes, con cultivo negativo) se deben generalmente a las muestras

de aquellos pacientes que están recibiendo tratamiento tuberculostático, o bien a una descontaminación excesiva y enérgica de las muestras en el laboratorio.

Estas técnicas, por sus características, deben aplicarse sistemáticamente sobre cualquier muestra clínica en la que sea preciso descartar estos patógenos, con la excepción, tal vez, de la sangre y los aspirados de médula ósea. Como es obvio, un examen microscópico negativo no descarta una posible infección subyacente por *M. kansasii*.

### Aislamiento primario

Para la recuperación óptima de *M. kansasii* de las muestras clínicas, es necesario emplear métodos que liberen los bacilos de los líquidos corporales (digestión) y eliminen la flora acompañante (descontaminación). Cuando el número de microorganismos en la muestra sea presumiblemente bajo, es necesario concentrarlos por centrifugación para lograr su detección. La mayor sensibilidad se logra con la combinación de, al menos, un medio de cultivo líquido (Middlebrook 7H9, radiométrico o automatizado no radiométrico) y otro sólido (Löwenstein-Jensen o Middlebrook 7H10 o 7H11).

El sistema radiométrico BACTEC TB es el método de referencia. Además, puede utilizarse para la identificación presuntiva entre el complejo *M. tuberculosis* y las otras micobacterias no tuberculosas, así como para las pruebas de sensibilidad. No obstante, éste sistema presenta las desventajas de no poder observar la morfología de las colonias, no detectar los cultivos mixtos, no estar automatizado y, sobre todo, por utilizar isótopos radiactivos ( $^{14}\text{C}$ ). Recientemente, han aparecido diversos sistemas que, utilizando medios líquidos no isotópicos (ESP Culture System II, MB/BacT y BACTEC MGIT 960), tienen una gran versatilidad, posibilidad de automatización e índices de recuperación y tiempos de detección cercanos al sistema radiométrico BACTEC. Todos estos medios han demostrado un excelente rendimiento en la recuperación rápida de *M. kansasii*, especialmente cuando se combinan con un medio sólido.

### Identificación

La identificación de *M. kansasii*, como el resto del género *Mycobacterium*, puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales, cromatográficos o genómicos (Tabla 1).

Los métodos tradicionales se basan en el tiempo de crecimiento, los aspectos morfológicos y de cromogenicidad de las colonias, así como en diferentes pruebas bioquímicas. *M. kansasii* es un bacilo ácido-alcohol resistente, de crecimiento lento (superior a 7 días en cultivo sólido) en un intervalo de temperaturas entre 32° y 42°C, aunque su temperatura ideal es de 37°C. Produce unas colonias fotocromógenas de color amarillo limón, entre lisas y rugosas, con un centro liso, denso, rodeado de una zona más transparente. Las características bioquímicas más notorias son la producción de catalasa, nitrato-reductasa y pirazinamidasas, así como la capacidad de hidrolizar el Tween® 80 (Tabla 2). Aunque el crecimiento lento de estos microorganismos demora semanas la identificación definitiva, estas pruebas no debieran ser totalmente eliminadas, especialmente en aquellos laboratorios que no disponen de sondas de DNA, o bien cuando los resultados obtenidos con los otros métodos son dudosos o de difícil interpretación.

Una buena alternativa a la identificación convencional es la utilización de las técnicas cromatográficas y, muy especialmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Aunque esta técnica proporciona una identificación rápida, precisa y de aplicación universal, no deja de ser un método complejo que requiere un instrumental costoso y un elevado entrenamiento. Por ello, quedaría reservada a los centros de referencia e investigación con la dotación y experiencia suficiente.

Actualmente, las técnicas de ácidos nucleicos parecen la mejor alternativa para una identificación rápida y precisa de las especies micobacterianas. Estas técnicas se basan en la aplicación de sondas de DNA, o en la amplificación mediante PCR. En la actualidad, cualquier laboratorio técnicamente facultado puede utilizar las sondas comerciales de DNA quimioluminiscentes (*Accuprobe*®), que permiten identificar por hibridación a partir del cultivo, de forma rápida (2 h) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, el complejo *M. avium*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*. Tras la descripción de las 5 subespecies o genotipos de *M. kansasii* se observó que la sonda de DNA inicial sólo hibridaba con el tipo I, por otra parte el más frecuente en humanos. Posteriormente, se desarrolló una nueva sonda para *M. kansasii*, disponible en la actualidad, que detecta los cinco genotipos, aunque parece no hibridar con la subespecie VI, descrita recientemente. El hecho de que las sondas estén limitadas a un grupo de especies micobacterianas y la necesaria orientación inicial sobre el tipo de sonda a utilizar, ha conducido al desarrollo de técnicas basadas en la amplificación (PCR) de una zona de DNA concreta y posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos obtenidos mediante enzimas de restricción (RFLP), hibridación en fase sólida o secuenciación, técnicas todas ellas fuera del ámbito de muchos laboratorios diagnósticos.

Por el momento, las dianas de amplificación mejor estudiadas son el gen *hsp65* que codifica la proteína micobacteriana de 65 kDa y las regiones de la subunidad ribosómica 16S. La técnica más utilizada es la PCR-RFLP del gen *hsp65*, que se basa en la amplificación de este gen y posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos obtenidos mediante restricción con dos enzimas (*BstEII* y *HaeIII*). Aunque existen otras técnicas similares (v. g. PCR-RFLP del 16S-23S), ésta es, actualmente, la mejor desarrollada, permitiendo una identificación precisa y económica de los aislamientos micobacterianos en una jornada laboral. La técnica es lo suficientemente discriminante como para diferenciar la especie y las 6 subespecies de *M. kansasii*, siendo fundamental para el conocimiento futuro de la epidemiología y la patogénesis de este microorganismo.

## TRATAMIENTO Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS

A diferencia de *M. tuberculosis*, las otras especies de micobacterias suelen presentar una mayor resistencia a los tuberculostáticos convencionales. Dentro de las no tuberculosas, *M. kansasii*, sin embargo, es una de las especies más sensibles. Las cepas salvajes son normalmente inhibidas por la rifampicina, isoniazida, etambutol, etionamida, estreptomycin, claritromicina, amikacina, sulfametoxazol, nuevas quinolonas y rifabutina, a concentraciones alcanzables en el suero tras las dosis terapéuticas habituales. Aunque existen algunas cepas con resistencia de bajo nivel a la isoniazida (0,2-1 µg/ml) y a la estreptomycin (2 µg/ml), no parece tener una gran importancia clínica ni terapéutica, siempre que se incluya en el régimen la rifampicina. Diversos estudios muestran que la rifampicina es el fármaco más eficaz, debiendo administrarse en todos los tratamientos iniciales. Sin embargo, la resistencia adquirida a este fármaco durante el tratamiento es un hecho bien conocido, documentándose un incremento de las recaídas en los últimos años. Por ello, aunque no existe un consenso sobre la realización de pruebas de sensibilidad en *M. kansasii*, la American

Thoracic Society recomienda realizarlas, al menos para la rifampicina, en todos los aislamientos iniciales de *M. kansasii*. Además, el estudio de la sensibilidad a la isoniazida, etambutol, estreptomina, claritromicina y nuevas quinolonas se debería realizar en todos aquellos casos con la tinción o el cultivo de las muestras persistentemente positivo, en las recaídas durante el tratamiento, y cuando se aísle una cepa de *M. kansasii* resistente a la rifampicina. Por supuesto, todos los casos de retratamiento deberían estar orientados mediante pruebas de sensibilidad a los fármacos.

Aunque las pruebas de sensibilidad no están bien estandarizadas, el método de las proporciones (agar 7H10 de Middlebrook) y el del BACTEC radiométrico son los más aceptados y sobre los que existe un mayor grado de acuerdo entre los especialistas. El objetivo de ambos es determinar si, en presencia de una concentración crítica del fármaco, el crecimiento supera el 1% de la población bacteriana obtenida paralelamente en otro cultivo con el mismo medio pero sin fármaco. El BACTEC radiométrico es el método más rápido (4-7 días) disponible en la actualidad. Apenas existe experiencia con el método de difusión en agar E-test®, aunque los datos preliminares son prometedores.

## BIBLIOGRAFIA

Alcaide F, Richter I, Bernasconi C, Springer B, Hagenau C, Schulze-Röbbecke R, Tortoli E, Martín R, Böttger Ec, Telenti A. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. J Clin Microbiol 1997; 35:1959-1964.

Anónimo. American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med. 1997; 156:S1-S25.

Heifets LB. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. CRC Press, Boca Raton 1991.

Inderlied CB. Antimycobacterial susceptibility testing: present practices and future trends. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 980-993.

Nolte FS, Metchock B. Mycobacterium. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology, 6ª ed. American Society for Microbiology, Washington 1995; 400-437.

Richter E, Niemann S, Rüscher-Gerdes S, Hoffner S. Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (Accuprobe) and molecular techniques. J Clin Microbiol 1999; 37:964-970.

Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 13:961-979.

Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol. 1997; 35:79-85.

Telenti A. Molecular technologies in diagnostic mycobacteriology. Symposium of diagnostic micobacteriology. Clin Microbiol Infect. 1997; 3 (supl 2):25 (S119).

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993; 31:175-178.

**Tabla 1. Métodos de identificación de *Mycobacterium kansasii*.**

Método	Ventajas	Inconvenientes	Comentarios
<b>Detección directa de la muestra</b>			
Microscopia	Rapidez Sencillez Economía	Baja sensibilidad Difícil diferenciación con otras especies	Orientación presuntiva a partir de cultivos líquidos Realizable en cualquier laboratorio
Amplificación genómica <sup>a</sup>	Teóricas: Rapidez Especificidad Sensibilidad	Laboriosidad Aplicación no universal Falsos negativos y positivos (?) Interpretación de los resultados No comercializado	No sustituiría el cultivo Necesidad de establecer su posible utilidad en áreas endémicas y en laboratorios de investigación
<b>Identificación a partir del cultivo</b>			
Bioquímica	Sencillez Aplicación universal Flexibilidad Economía	Lentitud: resultados en 2-4 semanas Laboriosidad No diferencia todas las especies Precisa gran crecimiento en cultivo	Utilizado como método de referencia durante muchos años Aplicable a partir de laboratorios de nivel II

Cromatografía <sup>b</sup>	Rapidez Aplicación universal Especificidad	Laboriosidad Infraestructura y entrenamiento especial Experiencia para su interpretación Cultivo con gran crecimiento Caro	Aplicación inicial en grandes laboratorios de referencia y de investigación.
Sondas de DNA	Rapidez Sencillez Especificidad Comercializadas	Una prueba por especie No distingue las subespecies del complejo <i>M. kansasii</i> . No detecta <i>M. kansasii</i> subespecie VI Caro	Prácticamente realizable en cualquier laboratorio
Amplificación genómica <sup>a</sup>	Rapidez Aplicación universal Especificidad Economía (PCR-RFLP)	Infraestructura para técnicas de PCR Confirmación bioquímica ocasional Contaminación potencial No comercializado	En laboratorios de nivel III y de referencia Buena relación coste-beneficio Utilidad en estudios epidemiológicos y patogénicos al diferenciar las 6 subespecies

<sup>a</sup> PCR y análisis postamplificación (RFLP, secuenciación, hibridación en fase sólida). En fase de investigación para la detección directa de la muestra.

<sup>b</sup> HPLC.

**Tabla 2. Pruebas convencionales claves en la identificación de micobacterias de crecimiento lento fotocromógenas**

Pruebas <sup>a</sup>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. szulgai</i> <sup>b</sup>
Temperatura óptima de crecimiento	37 °C	30 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Crecimiento a 28 °C	> 7 días	< 7 días	> 7 días	> 7 días	< 7 días
Pigmentación	F	F	F <sup>c</sup>	F <sup>c</sup>	E/F
Morfología colonial en LJ	LR/L	L/LR	L	L	L/R
Niacina	-	-/+	+/-	-	-
Reducción de nitratos	+	-	-	-	+
Catalasa SM > 45 mm	+	-	+	+	+
Catalasa a 68°C	+	-	+	+	+
Hidrólisis Tween® 80	+	+	-	+	-/+
Reducción del telurito	-/+	-/+	+	-	+/-
Pirazinamidasa (4 días)	-	+	+	-	+
Arilsulfatasa (3 días)	-	-/+	-	-	V
Crecimiento en TCH	+	-	+	+	+

<sup>a</sup> Símbolos y abreviaturas: +: positivo; -: negativo; +/-: positivo (50-69%); -/+ : positivo (30-49%); V: variable; ND: no disponible; R: rugoso; L: liso; LR: liso-rugoso (intermedio). LJ: medio de Löwenstein-Jensen; F: fotocromógena; E: escotocromógena; SM: semicuantitativa; TCH: Hidracida del ácido 2 tiofeno-carboxílico (10 µg/ml).

<sup>b</sup> *M. szulgai* puede ser escotogromógena a 35-37°C y fotocromógena a 25°C.

<sup>c</sup> *M. simiae* y *M. asiaticum* producen tras la fotoinducción un pigmento de menor intensidad que *M. kansasii* y *M. marinum*. Los aislamientos de *M. simiae* pueden requerir un mayor periodo de fotoinducción o de incubación posterior.