

*Higiene y Sanidad Ambiental*, **15** (2): 1309-1314 (2015)

## **Investigación de Micobacterias no tuberculosas (MNT) en aguas de viviendas de pacientes con infección causada por MNT**

### ***INVESTIGATION OF NON TUBERCULOUS MYCOBACTERIA (NTM) FROM HOUSE HOLD WATER IN PATIENTS WITH INFECTION CAUSED BY NTM***

<sup>1,2</sup>Rossana ABREU, <sup>1,2</sup>María LECUONA, <sup>1</sup>Beatriz CASTRO, <sup>2</sup>Cristobalina RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, <sup>1</sup>Silvia CAMPOS, <sup>1</sup>Miriam HERNÁNDEZ-PORTO, <sup>2</sup>Angeles ARIAS

<sup>1</sup> Hospital Universitario de Canarias, San Cristóbal de La Laguna, Islas Canarias, España

<sup>2</sup> Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de la Laguna, Islas Canarias, España

*Autor para correspondencia:* Ángeles Arias. Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de La Laguna. Apartado de correos 456. Código postal 38200. San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife. , Islas Canarias, España E-mail: angarias@ull.es

---

#### **RESUMEN**

Las Micobacterias no tuberculosas (MNT) son patógenos humanos oportunistas que viven en el ambiente, tanto en aguas como en suelo. Son capaces de sobrevivir en los sistemas de distribución y almacenamiento de los servicios de abastecimientos de agua potable y desde ahí ser capaces de infectar y causar infecciones, principalmente en personas con inmunosupresión debida a otras enfermedades, tratamientos médicos u otras causas.

Hemos investigado la presencia de Micobacterias No Tuberculosas (MNT) en el agua de grifo en viviendas de pacientes previamente diagnosticados de infecciones por MNT en el Servicio de Microbiología en el Hospital Universitario de Canarias durante el año 2014.

La prevalencia total del aislamiento de MNT en las aguas fue del 25% y la coincidencia de especie con la muestra clínica fue del 67%. *Mycobacterium fortuitum* fue la especie predominante, tanto en las aguas como en la infección clínica.

En conclusión, no hemos podido demostrar una correlación entre el patrón de distribución ambiental de aislados de NTM y la infección clínica, pero el ambiente acuático si podría ser un factor contribuyente a estas infecciones, por lo que es necesario realizar más investigaciones.

**Palabras clave:** Micobacterias no tuberculosas, aguas de grifo de las viviendas, muestras clínicas, *Mycobacterium fortuitum*.

#### **ABSTRACT**

Non-tuberculosis Mycobacteria (NTM) are human opportunistic pathogen who live in the environment, both in water and in soil. They are capable of surviving in the distribution and storage systems of the services of drinkable water supplies and from there to be capable of infecting and causing infections, principally in people with immunosuppression due to other diseases, medical treatments or other reasons.

We have investigated the presence of Non-tuberculosis Mycobacteria (NTM) in tap water of houses of the patients diagnosed with episodes of NTM in the University Hospital of Canary Islands.

The total prevalence of isolates of NTM in water was 25 % and the coincidence of species with the clinical sample was 67 %. *Mycobacterium fortuitum* was the predominant species, both in water and in clinical infection. In conclusion, we could not demonstrated a correlation between the distribution pattern of environmental NTM isolates and clinical infection patterns, but the acuatic environment could be a cause factor of that infections, while further investigation are needed.

**Keywords:** Non-tuberculosis Mycobacteria (NTM), tap water, clinical samples, *Mycobacterium fortuitum*.

## INTRODUCCIÓN

Las Micobacterias no tuberculosas (MNT) son patógenos humanos oportunistas que viven en el ambiente, tanto en aguas como en suelo y son capaces de sobrevivir en los servicios de abastecimientos de agua potable de edificios y viviendas, e incluso de hospitales. Están perfectamente adaptadas para residir en los sistemas de distribución de agua potable y son relativamente resistentes a los desinfectantes y se adhieren a las superficies formando biopelículas, lo que disminuye la eficacia de la desinfección (Ashbolt, 2015, Lührig, *et al.*, 2015), al tiempo que son capaces de crecer en bajas concentraciones de materia orgánica (Falkinham, 2010, 2013, 2015, Falkinham, *et al.*, 2015).

El crecimiento de estos microorganismos en los sistemas de distribución de agua potable pública está influenciado por varios factores, incluyendo la concentración de materia orgánica biodegradable, interacciones microbianas, la concentración de desinfectantes residuales libres, tiempo de residencia, factores ambientales (incluyendo el pH, la temperatura y la turbidez del agua), el diseño y las características de los tubos de distribución (Vaerewijck, *et al.*, 2005, Falkinham, *et al.*, 2015).

Las MNT no fueron aceptadas como patógenos humanos hasta 1950, pero en la actualidad la patogenicidad de estas bacterias es bien reconocida. Han sido descritas más de 150 especies de MNT y se siguen identificando nuevas especies (Daley y Griffith, 2010). Diversos estudios sugieren que la transmisión persona-persona es rara, produciéndose la mayoría de los casos a partir de microorganismos distribuidos en el medio ambiente. Al parecer, las vías principales de infección son la inhalación, partículas o aerosoles, la ingestión y el contacto con agua contaminada. En los últimos años se han publicado estudios de la tendencia creciente del aislamiento de MNT en infecciones humanas (Velayati, *et al.*, 2014, Tortoli, 2014, Prevots, *et al.*, 2014, Zlojtro, *et al.*, 2015).

Para las personas en situación de riesgo de adquirir una infección por MNT, se pueden tomar medidas para reducir la exposición a MNT, como evitar la inhalación de polvo de tierra de macetas y de aerosoles de duchas, bañeras de hidromasaje y humidificadores (Singla, *et al.*, 2014).

El objetivo de nuestro estudio fue determinar la presencia de Micobacterias no tuberculosas en las aguas de consumo público de las viviendas de

pacientes afectados por infecciones por estos microorganismos, que han sido diagnosticados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Canarias en el año 2014.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un muestreo dirigido a investigar la presencia de Micobacterias no tuberculosas (MNT) en el agua de grifo en viviendas de pacientes diagnosticados con episodios de MNT en la Isla de Tenerife. Las muestras fueron recolectadas en un período de 13 semanas (2 junio- 29 agosto, 2014).

Para ello, previamente se revisaron los aislamientos de MNT en pacientes diagnosticados en el Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Canarias durante el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2013 y 30 de junio de 2014. Se contactó telefónicamente con estas personas, y se les informó sobre la naturaleza del estudio y se les solicitó su consentimiento verbal para participar en el mismo. Con las que consintieron verbalmente se concertó una cita para recoger el agua en su domicilio.

Se establecieron como criterios de inclusión: haber padecido una infección por micobacterias no tuberculosas en el período de estudio, vivir en la misma vivienda durante 3 o más años antes del diagnóstico de la enfermedad por MNT y consentimiento para participar en el mismo.

En el momento de la toma de la muestra, se procedió a la determinación del cloro libre residual y la temperatura del agua. El cloro libre residual se determinó mediante el método de Dietil-P-Fenilendiamina (DPD O DFD) y la temperatura mediante el termómetro Modelo HT-5981. Al mismo tiempo, en un recipiente normalizado de polipropileno, se recogieron muestras para la determinación del pH y turbidez, que se realizó en el laboratorio. Para la determinación de la turbidez se utilizó el turbidímetro TurbiCheck (Lavibond®) y para el pH, el equipo pH-Meter GLPy el electrodo 50 14 T21 (Crison®)

Para la investigación de micobacterias, se recogió de cada punto de muestreo después de 1 a 2 minutos de descarga, 500 ml de agua en recipientes estériles que contenían tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (Merck, Darmstadt, Germany) al 10% para neutralizar cualquier concentración de cloro libre presente en la muestra.

Ambas muestras se mantuvieron en temperatura de refrigeración hasta su procesamiento, que ocurría dentro de las 24 horas siguientes a la toma de la muestra.

#### Aislamiento e identificación de micobacterias

Se utilizó el cloruro de cetilpiridinio (CPC) (Sigma-Aldrich. St Louis. MO. USA) para la descontaminación de la muestra. Los 500 ml de agua recogidos se trataron con CPC para obtener una concentración final de 0,005% de cloruro de cetilpiridinio (CPC) agitando la mezcla durante 30 segundos. Después de un tiempo de exposición de 30 minutos a temperatura ambiente, las muestras se filtraron a través de filtros de nitrato de celulosa 0,45 micras y 47 mm de diámetro (Sartorius AG 3707 Goettingen, Germany). A continuación los filtros se

fragmento específico de un gen de *Mycobacteria* (SPEED-OLIGO®) (Vircell) (Granada, Spain).

#### RESULTADOS

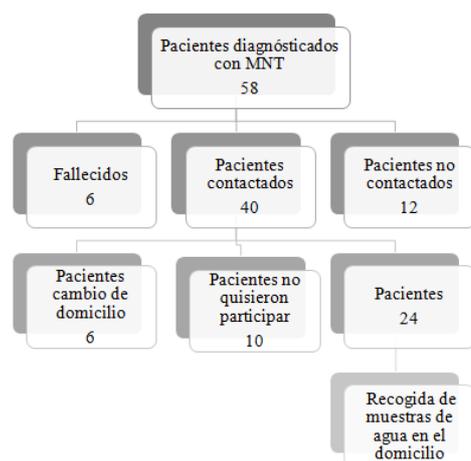
El total de pacientes diagnosticados con MNT en el Hospital Universitario de Canarias en el período de estudio fueron 58. De éstos, en 34 no fue posible la recogida de la muestra de agua por distintas causas, por lo que quedaron un total de 24 pacientes que cumplían los requisitos y a los que se pudo tomar la muestra de agua de sus viviendas, requerida para la búsqueda de MNT (Figura 1).

La temperatura, los niveles cloro libre residual, turbidez y pH de las muestras de agua, oscilaron entre 21,1-23,4°C y <0,3-0,7 mg/l, 0,1 a 0,65 UNF y 8.3 – 8.6 respectivamente (Tabla 1).

En la Tabla 2 se observan los resultados de los aislamientos clínicos de MNT de los pacientes del estudio y los aislados obtenidos del agua de las viviendas de los pacientes. La prevalencia de MNT en el total de aguas analizadas fue del 25%. En el caso de las muestras clínicas, la especie más aislada fue *M. fortuitum* (70,8%), seguida de *M. chelonae* (16,7%). Los aislados de MNT procedían de muestras de esputo (54,2%), hemocultivos (20,8%), biopsias (12,5%) y otros exudados (12,5%).

En el caso del agua de abastecimiento, el predominio fue igualmente para la especie *M. fortuitum* (67,7%).

**Figura 1.** Esquema de participación de los pacientes diagnosticados con MNT.



enjuagaron con 100 ml de agua destilada estéril, para eliminar CPC residual y uno de los filtros se transfirió a una placa de Middlebrook 7H11 agar (bioMérieux® Marcy L' étoile, France), que se incubó a 36 °C, en una cámara húmeda durante 51 días. Se revisaron las placas en las primeras horas para descartar aquellas que habían sido contaminadas o sufrido variaciones de pH que pudieran inhibir el crecimiento de micobacterias. Semanalmente y durante un periodo mínimo de 8 semanas se observó la presencia de crecimiento, velocidad de crecimiento y pigmentación de las colonias. Las colonias sospechosas se tiñeron por la técnica de Ziehl Neelsen para el hallazgo de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Las colonias positivas fueron subcultivadas en el agar Löwenstein-Jensen (bioMérieux® Marcyétoile, France) para su identificación a nivel de especies por un método oligocromatográfico para la detección cualitativa del género *Mycobacterium* basado en la amplificación de un

#### DISCUSIÓN

Micobacterias no tuberculosas han sido aisladas en aguas potables en todo el mundo (Thompson et al. 2013; Briancesco et al, 2014.; Fernández-Rendon et al. 2012; Klanicova et al, 2013; Genc et al, 2013.; Crago et al. 2014; Donohue et al. 2015).

El porcentaje total del aislamiento de MNT en nuestras aguas fue del 25%. En cuatro casos la misma especie se identificó tanto en el paciente como en el agua del domicilio, *M. fortuitum* en 3 casos y *M. chelonae* en 1 caso.

Nishiuchiet al. (2007) estudiaron el aislamiento de MNT de las viviendas de 49 pacientes con enfermedad pulmonar por *M. avium* y de 43 voluntarios sanos sin enfermedad, obteniendo que de once muestras que contenían *M. avium* complex, diez eran de viviendas de pacientes y 1 era de la residencia de un voluntario, indicando que ocho cepas eran *M. avium*, y tres *M. intracellulare*, lo que demostraba la relación con las especies que causaban enfermedad pulmonar en la población japonesa.

Falkinham (2011) realizó un estudio de aislamiento de MNT en el agua de viviendas de 31 pacientes en los Estados Unidos y Canadá con enfermedad por MNT. Los pacientes incluidos en el estudio tenían infección por *M. avium* (9), *M. intracellulare* (6), *M. aviumcomplex* (11), *M. abscessus*

**Tabla 1.** Resultados de los parámetros fisicoquímicos estudiados.

Muestras	Parámetros			
	Temperatura (°C)	Cloro libre residual (ppm)	Turbidez (UNF)	pH a 20°C
1	22,3	0,43	0,20	8,37
2	21,4	0,48	0,56	8,45
3	22,1	0,48	0,28	8,59
4	22,0	0,19	0,42	8,6
5	22,4	0,40	0,10	8,37
6	22,5	0,38	0,40	8,45
7	22,0	0,33	0,15	8,59
8	21,4	0,41	0,62	8,6
9	22,1	0,64	0,10	8,37
10	22,3	0,39	0,57	8,45
11	21,6	0,42	0,13	8,59
12	22,1	0,37	0,22	8,6
13	21,1	0,46	0,10	8,45
14	22,1	0,44	0,36	8,59
15	22,3	0,47	0,17	8,6
16	21,4	0,45	0,65	8,37
17	22,1	0,37	0,28	8,45
18	22,2	0,44	0,24	8,59
19	21,4	0,64	0,56	8,6
20	22,1	0,43	0,13	8,37
21	22,3	0,48	0,37	8,45
22	23,4	0,48	0,10	8,59
23	22,7	0,19	0,12	8,6
24	22,3	0,47	0,19	8,45

(4) y *M. xenopi* (1). En el 49% de las viviendas crecieron MNT incluyendo *M. avium* (10), *M. intracellulare*(10), *M. malmoense* (5), *M. szulgai* (3), *M. gordonae* (6), *M. chelonae* (2), *M. scrofulaceum* (1), *M. triviale* (1), y *M. terrae* (1). En el 17/37 (46%) de las viviendas encontraron la misma especie que presentaban los pacientes.

Brown-Elliott et al (2011) informaron de la identificación de *M. porcinum* de 24 pacientes en un hospital universitario de Galveston durante un período de 5 años. *M. porcinum* se consideró un patógeno en 11 (46%) de 24 pacientes infectados, incluyendo 4 pacientes con enfermedad adquirida en la comunidad. Se recogieron muestras de agua del hospital y de las viviendas de la ciudad de Galveston. Los resultados mostraron una gran similitud entre las cepas de *M. porcinum* obtenidas de las aguas y de los pacientes, indicando que las aguas eran el reservorio de estas cepas.

Thompson (2013) en un estudio examinó el agua de las viviendas y aerosoles de duchas de 20 pacientes con enfermedad pulmonar por MNT. Las micobacterias aisladas de muestras clínicas y en el agua coincidieron en 7 pacientes (35%) casos: *M. abscessus* (3), *M. avium* (1), *M. gordonae* (1), *M. lentiflavum* (1) y *M. kansasii* (1).

Las aguas de nuestro estudio son ligeramente alcalinas, y presentan valores de pH, de turbidez y de cloro libre residual dentro de los valores paramétricos indicados en la legislación española vigente (RD 140/ 2003). No hemos podido relacionar estos valores con la presencia o no de MNT, si bien, como indica Vaerewijck et al. (2007), estos factores relacionados con el agua pueden influir en la presencia de MNT. Todas las aguas de nuestro estudio estaban desinfectadas con cloro y está demostrado que estas bacterias son resistentes a los niveles de cloración existentes en los sistemas de distribución de agua de consumo humano (Thompson et al. 2013).

Este estudio tiene varias limitaciones. El tiempo que transcurre entre la exposición de una persona a MNT por el agua y la infección y diagnóstico de la enfermedad puede

ser muy largo, ya que muy a menudo un paciente ha tenido síntomas durante muchos años antes de ser diagnosticado, y por lo tanto, establecer el entorno en el que se expusieron es muy difícil. Otra limitación es que no se ha realizado la secuenciación genética de los aislados para evaluar la similitud genética entre los obtenidos en muestras ambientales y clínicas.

En conclusión, no hemos podido demostrar una correlación entre el patrón de distribución ambiental de aislados de NTM y la infección clínica, pero consideramos que el ambiente acuático podría ser un factor contribuyente a estas infecciones, por lo que es necesario realizar más investigaciones.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido subvencionado por la Fundación Cajacanarias (Referencia AGUA10/2014).

**Tabla 2.** Aislamientos de MNT en pacientes y muestras de aguas.

Nº Paciente	MNT	
	Aislados clínicos	Aislado en muestra de agua
1	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
2	<i>M. fortuitum</i>	-
3	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
4	<i>M. fortuitum</i>	-
5	<i>M. fortuitum</i>	-
6	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
7	<i>M. fortuitum</i>	-
8	<i>M. fortuitum</i>	-
9	<i>M. fortuitum</i>	-
10	<i>M. chelonae</i>	-
11	<i>M. fortuitum</i>	-
12	<i>M. fortuitum</i>	-
13	<i>M. fortuitum</i>	-
14	<i>M. chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>
15	<i>M. fortuitum</i>	-
16	<i>M. chelonae</i>	-
17	<i>M. fortuitum</i>	-
18	<i>M. chelonae</i>	-
19	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
20	<i>M. fortuitum</i>	-
21	<i>M. fortuitum</i>	-
22	<i>M. fortuitum</i>	-
23	<i>M. abscessus</i>	-
24	<i>M. abscessus</i>	<i>M. peregrinum</i>

## BIBLIOGRAFÍA

Ashbolt NJ. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Curr Environ Health Rep* 2015; 2(1):95-106.

Briancesco R, Alaimo C, Bonanni, Delle SA, Di Gianfilippo F, Grassano L, Moscatelli R, Ottaviano C, Paradiso R, Quintiliani S, Semproni M, Bonadonna L. An Italian investigation on non-tuberculous mycobacteria in an urban water supply. *Ann Ig* 2014; 26(3): 264–271.

Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, Tichindelean C, Sarria JC, McNulty S, Vasireddy R, Bridge L, Mayhall CG, Turenne C, Loeffelholz M. Five-year outbreak of community- and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. *J Clin Microbiol* 2011 Dec;49(12):4231-4238.

Crago B, Ferrato C, Drews SJ, Louie T, Ceri, H, Turner R, Roles A, Louie M. Surveillance and molecular characterization of non-tuberculous mycobacteria in a hospital water distribution system over a three-year period. *J Hosp Infect* 2014; 87(1): 59–62.

Daley CL, Griffith DE Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:665–671.

Donohue MJ, Mistry JH, Donohue JM, O'Connell K, King D, Byran J, Covert T, Pfaller S. Increased Frequency of Nontuberculous Mycobacteria detection at potable water taps within the United States. *Environ. Sci. Technol* 2015 (In press)

Falkinham JO 3<sup>rd</sup>. Nontuberculous Mycobacteria from Household Plumbing of Patients with Nontuberculous Mycobacteria Disease. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(3): 419–424.

Falkinham JO 3<sup>rd</sup>, Hilborn ED, Arduino MJ, Pruden A, Edwards MA. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Health Perspect.* 2015 (In press)

Falkinham JO 3<sup>rd</sup>. Ecology of nontuberculous mycobacteria--where do human infections come from?. *Semin Respir Crit Care Med* 2013 Feb;34(1):95-102.

Falkinham JO. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria *Future Microbiol.* 2010 Jun; 5(6):951-60.

Fernandez-Rendon E, Cerna-Cortes JF, Ramirez-Medina MA, Helguera-Repetto AC, Rivera-Gutierrez S, Estrada-Garcia T, Gonzalez-Y-Merchand JA. *Mycobacterium mucogenicum* and other non-tuberculous mycobacteria in potable water of a trauma hospital: a potential source for human infection. *J Hosp Infect.* 2012 Jan;80(1):74-76.

Genc GE, Richter E, Erturan Z. Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital waters in Turkey. *APMIS* 2013 Dec;121(12): 1192-1197.

Klanicova B, Seda J, Slana I, Slany M, Pavlik I. The tracing of mycobacteria in drinking water supply systems by culture, conventional, and real time PCRs. *Curr Microbiol* 2013 Dec;67(6):725-731.

Lührig K, Canbäck B, Paul CJ, Johansson T, Persson KM, Rådström P. Bacterial community analysis of drinking water biofilms in southern Sweden. *Microbes Environ* 2015 Mar 24;30(1):99-107.

Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, Tamaru A, Taguri T, Kira Y, Hiraga T, Hirotsu A, Yoshimura K, Miki M, Ito M. The recovery of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clin Infect Dis* 2007; 45:347–351.

Prevots DR, Adjemian J, Fernandez AG, Knowles MR, Olivier KN. Environmental risks for nontuberculous mycobacteria. Individual exposures and climatic factors in the cystic fibrosis population. *Ann Am Thorac Soc.* 2014 Sep;11(7): 1032-1038.

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. (BOE 45 del 21/02/2003)

- Singla A, Kundu H, P B, Singh S, Singh K, Jain S. Physico-chemical and bacterial evaluation of packaged drinking water marketed in Delhi - potential public health implications. *J ClinDiagn Res* 2014 Mar;8(3):246-250.
- Thomson R, Tolson C, Carter R, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM. *J ClinMicrobiol* 2013; Sep;51(9):3006-3011.
- Thomson RM, Carter R, Tolson C, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. Factors associated with the isolation of Nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water system in Brisbane, Australia. *BMC Microbiol* 2013 Apr 22;13:89.
- Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev* 2014 Oct; 27(4):727-52.
- Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 2005 Nov; 29(5):911-934.
- Velayati AA, Farnia P, Mozafari M, Malekshahian D, Seif S, Rahideh S, Mirsaedi M. Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria isolates from clinical and environmental sources of a metropolitan city. *PLoS One* 2014 Dec 8;9(12):e114428.
- Zlojtro M, Jankovic M, Samarzija M, Zmak L, Jankovic VK, Obrovac M, Zlojtro I, Jakopovic M. Nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with a hospital's water supply contamination: a case series of 135 patients. *J Water Health* 2015 Mar;13(1):125-30.