

Detección de micobacterias no tuberculosas en muestras ambientales: comparación entre cultivo y PCR a tiempo real

NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA DETECTION IN ENVIROMENTAL SAMPLES: COMPARASION BETWEEN CULTURE AND REAL TIME PCR

Rossana ABREU RODRÍGUEZ¹, Beatriz CASTRO HERNÁNDEZ¹, Ángeles ARIAS RODRÍGUEZ², Silvia CAMPOS GUTIÉRREZ¹, Miriam HERNÁNDEZ PORTO¹, Cristobalina RODRÍGUEZ ÁLVAREZ², María LECUONA FERNÁNDEZ^{1,2}

¹ Servicio de Microbiología y Control de la Infección, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife (España).

² Área de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de la Laguna, Tenerife (España).

RESUMEN

Introducción y objetivo: Las micobacterias no tuberculosas (MNT) son patógenos emergentes, cuyo hábitat es ambiental y que en los últimos años ha aumentado su importancia como agentes etiológicos de infección humana. El objetivo de este estudio fue comparar la prueba molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real y el método convencional, el cultivo (Middelbrook 7H11 agar), para la detección rápida de MNT en muestras ambientales.

Material y Métodos: Se estudiaron 217 muestras de agua de consumo humano recogidas en distintos puntos de la Isla de Tenerife. Para la realización de la PCR a tiempo real se preparó el tubo de reacción (20 µl) con 10 µl KAPA SYBR@FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, 0,8 µl Forward primer (900nM), 0,8 µl Reverse primer (300nM), 3 µl agua libre RNasa, 0,4 µl ROX Low y 5 µl eluido (ADN muestra). Se compararon los resultados obtenidos con el cultivo con los obtenidos mediante la PCR a tiempo real, con la finalidad de determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de esta prueba diagnóstica.

Resultados: De las 127 muestras positivas por cultivo encontramos que el 48,8% (62) también fueron positivas mediante PCR a tiempo real a partir de la muestra directa. De las 90 muestras negativas para *Mycobacterium* spp por cultivo, el 100% de las mismas también fueron negativas por PCR a tiempo real, especificidad de 100%.

Conclusiones: La PCR a tiempo real a partir de muestra directa de agua presentó una baja sensibilidad y alta especificidad para detectar *Mycobacterium* spp. Es necesario seguir profundizando en este tipo de estudios para lograr validar una técnica más sensible en el diagnóstico rápido, de las enfermedades causadas por micobacterias no tuberculosas.

Palabras clave: Mycobacterias no tuberculosas, cultivo, reacción en cadena de la polimerasa, PCR, agua de consumo.

ABSTRACT

Introduction and objective: Nontuberculous mycobacteria (NTM) are an emergent, pathogen whose habitat is environmental and that in the last years has increased its importance as etiological agents of human infection. The aim of this study was to compare the real time polymerase chain reaction (PCR) molecular test and the conventional method, the culture (Middelbrook 7H11 agar), for the rapid detection of NTM in environmental samples.

Material and methods: There were studied 217 water samples of human consumption gathered in different points of the Tenerife Island. To perform real time PCR the reaction tube was prepared (20 µl) with 10 µl KAPA SYBR@FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, 0,8 µl Forward primer (900nM), 0,8 µl Reverse primer (300nM), 3 µl water free RNAsa, 0,4 µl ROX Low and 5 µl eluate (DNA sample). There were compared the results obtained with the culture with those obtained by real time PCR, with the purpose of determining the sensibility, specificity and predictive values of this diagnostic test.

Results: Of 127 positive samples by culture we found that 48,8 % (62) also were positive by real time PCR from the direct sample. Of 90 negative samples for Mycobacterium spp by culture, 100 % of the same ones also were negative by real time PCR, specificity of 100 %.

Conclusions: The real time PCR from direct sample of water presented a low sensibility and high specificity to detect Mycobacterium spp. It is necessary to continue working into this type of studies to achieve a higher sensibility and rapid technology.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, culture, polymerase chain reaction, PCR, drinking water.

INTRODUCCIÓN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) han sido reconocidas como agentes etiológicos de varias infecciones respiratorias y extra-respiratorias de individuos inmunocompetentes (Kendall, *et al.*, 2013). Estas "micobacterias ambientales" son saprófitos de vida libre que se han aislado de diferentes hábitats, tanto naturales como creados por el hombre (Cassidy, *et al.*, (2009); Falkinham, 2009), lo que determina que se puedan encontrar colonizando los sistemas de distribución de agua potable, de edificios, viviendas, y hospitales en forma de biopelículas. La capacidad de adherirse a las superficies les confiere resistencia a los desinfectantes comúnmente utilizados para tratar las aguas de abastecimiento público, lo que disminuye la eficacia de la desinfección (Wingender and Flemming, 2011; Falkinham, 2015; Ashbolt, 2015; Lührig, *et al.*, 2015). En ocasiones, las infecciones humanas con MNT se producen por el contacto con el medio ambiente pudiendo las biopelículas funcionar como reservorios ambientales (Bryant, *et al.*, 2013; Mirsaedi, *et al.*, 2014).

Las tasas de incidencia y mortalidad de las infecciones por MNT han ido en aumento en todo el mundo en la última década (Martin-Casabona, *et al.*, 2004; Bryant, *et al.*, 2013; Mirsaedi *et al.*, 2014a,b; Mirsaedi, *et al.*, 2014a), sugieren que las infecciones por MNT rara vez se propaga de persona-persona, produciéndose la mayoría de los casos a partir de microorganismos distribuidos en el medio ambiente. Por lo tanto, la distribución de las especies de MNT en el medio ambiente local de las especies de MNT es una clave importante para la predicción de las especies de MNT aislados de pacientes.

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, Lecuona *et al.*, 2016) siguiendo diversas técnicas de diagnóstico microbiológico.

En los últimos años se ha avanzado en las posibilidades del diagnóstico microbiológico al disponer

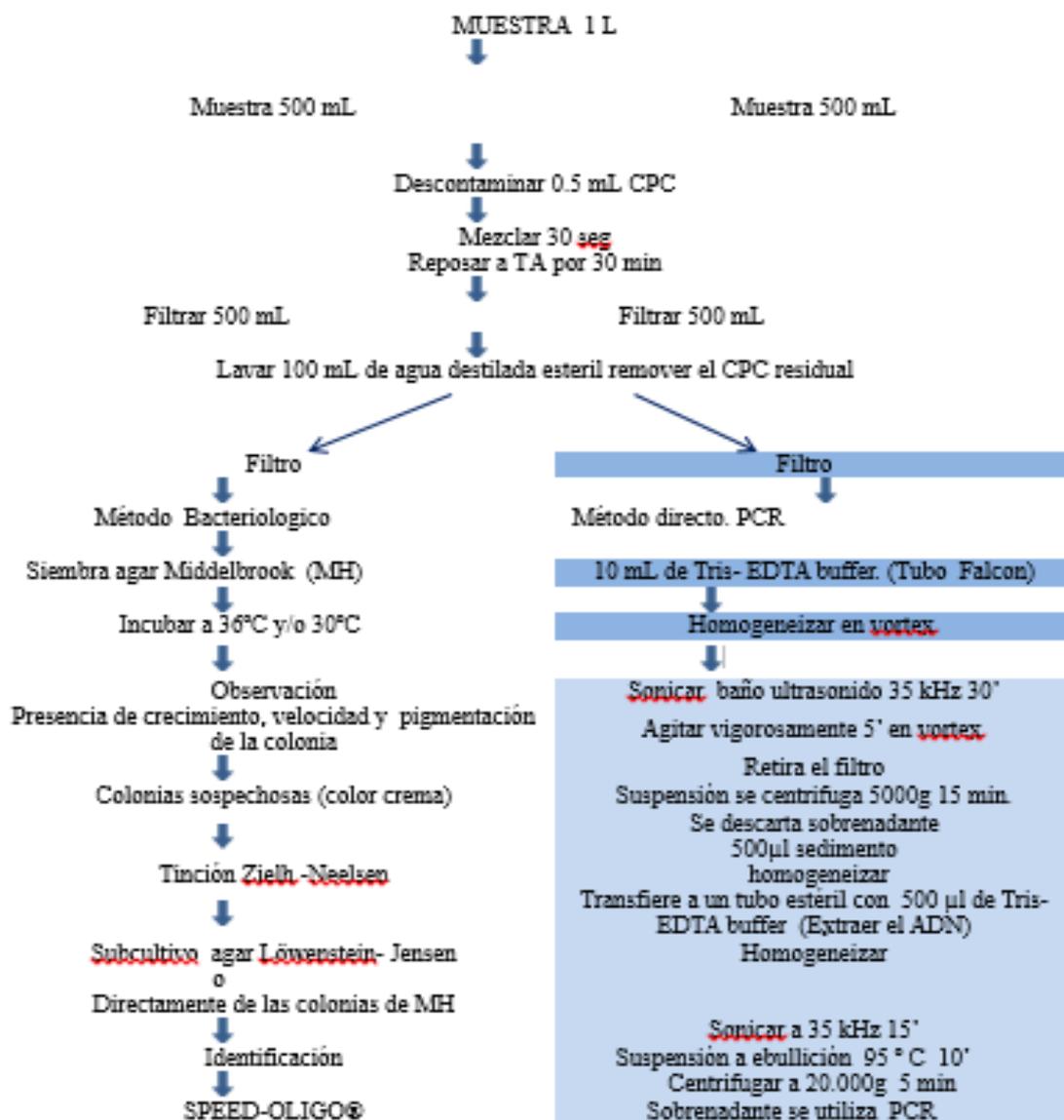
de medios de cultivos que permiten un aislamiento más rápido de las micobacterias, así como de métodos moleculares que basados en técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) e hibridación reversa con sondas específicas permiten identificar fácilmente un número muy elevado de micobacterias no tuberculosas.

El objetivo de este estudio fue comparar los resultados obtenidos en la detección de MNT, a través de los dos métodos ensayados el método convencional, el cultivo en Middelbrook 7H11 agar, y el método molecular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, con el fin de estudiar la utilidad de ésta como técnica rápida y confiable de detección de MNT en muestras directas de aguas de consumo

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo sistemático dirigido en base al tamaño de las poblaciones de la Isla de Tenerife. La toma de muestras de agua de consumo humano, se realizó en el periodo entre los meses de marzo a noviembre de 2014. Se tomaron un total de 217 muestras de aguas de consumo público procedentes del grifo. En cada punto de muestreo se recogió un litro de agua en recipientes estériles con tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) para neutralizar la acción del cloro libre presente y las muestras fueron transportadas al laboratorio a temperaturas de refrigeración (4°C) para su procesamiento. Para la descontaminación de la muestra se utilizó el método de cloruro de cetilpiridinio (CPC). Cada muestra se redujo a la mitad, 500ml para la primera fase (método convencional) y 500ml para la segunda fase (método molecular PCR a tiempo real). Cada 500 ml de muestra son tratados CPC hasta una concentración final de 0,005%, agitando la mezcla durante 30 segundos. Después de un tiempo de exposición a temperatura ambiente de 30 minutos, las muestras se filtraron a través de filtros de nitrato de celulosa 0,45 micras y 47mm de diámetro. A continuación para eliminar CPC residual, los filtros se enjuagaron con 100mL de agua destilada estéril y uno de los filtros se transfirió inmediatamente al medio selectivo

Figura 1. Protocolo utilizado para aislamiento de micobacterias en muestras de aguas.



Middlebrook 7H11 agar (suplementado con Middlebrook OADC Enrichment) (MB7H11). La técnica de cultivo completa ha sido descrita previamente por Lecuona *et al.* (2016). El segundo filtro se sometió a un protocolo de extracción de ADN. La metodología utilizada constó de un primer paso de extracción del ADN a partir del filtrado de 500 mL de la muestra con membrana de nitrocelulosa 0.45µm. Se recoge la membrana y se le añade 10 mL de Tris EDTA (TE) en un tubo estéril. Se ultrasonifica durante 30 min obteniendo el eluido. Para la realización de la PCR a tiempo real, se preparó el tubo de reacción (20 µl) con 10 µl KAPA SYBR®FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, 0,8 µl Forward primer (900nM), 0,8 µl Reverse primer (300nM), 3 µl agua libre RNAsa, 0,4

µl ROX Low y 5 µl eluido (ADN muestra). En este estudio, se estableció una PCR a tiempo real utilizando la pareja de primer genéricos 110F/1571R diseñados por Radomski *et al.* (2010). En cada ensayo, se incluyó un control negativo que contenía únicamente agua. La PCR a tiempo real se realizó en el termociclador Mx3000p con las siguientes condiciones de amplificación: 3 minutos a 95°C, 40 ciclos iniciando con 3 segundos a 95°C y 20 segundos a 55°C. El protocolo seguido, en ambas técnicas, se observa en la Figura 1. Se compararon los resultados obtenidos de PCR con los del cultivo, con la finalidad de determinar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de esta prueba diagnóstica.

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos de las dos técnicas de detección de MNT a partir de muestras directa de agua.

| Micobacteria aislada | Muestras positivas para MNT | |
|--|-----------------------------|-------|
| | Cultivo (MB7H11 agar) | rtPCR |
| <i>M. fortuitum</i> | 105 | 50 |
| <i>M. canariasisense</i> | 4 | 3 |
| <i>M. chelonae</i> | 4 | 2 |
| <i>M. peregrinum</i> | 3 | 3 |
| <i>M. abscessus</i> | 2 | 1 |
| <i>M. simiae</i> | 2 | 1 |
| <i>M. mucogenicum</i> | 2 | 0 |
| <i>M. conceptionense</i> / <i>M. senegalense</i> | 2 | 1 |
| <i>M. septicum</i> | 1 | 0 |
| <i>M. phocaicum</i> | 1 | 0 |
| <i>M. porcinum</i> / <i>M. neworleansense</i> | 1 | 1 |

RESULTADOS

De un total de 217 muestras de agua de consumo público ensayadas, se obtuvieron 127 muestras positivas por cultivo con medio MB7H11 agar. De éstas, mediante la técnica de PCR a tiempo real se detectaron 62 positivas, obteniéndose una sensibilidad del 48,8%. De las 90 muestras negativas para *Mycobacterium* spp. obtenidas por cultivo, el 100% de las mismas fueron negativas por PCR a tiempo real, especificidad del 100%, con un valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 58,5%.

La comparación según especie con la detección de *Mycobacterium* (Tabla 1), se observa que es variable. La mayoría de las micobacterias fueron *M. fortuitum*, de 105 aisladas mediante cultivo, la técnica de PCR tiempo real solo detectó 50.

DISCUSIÓN

Estudios previos de nuestro grupo de investigación evidenciaron la elevada colonización del agua por MNT en la Isla de Tenerife (Lecuona, *et al.*, 2016). Debido a esta elevada prevalencia de MNT en nuestras ambientales consideramos la importancia de disponer de una técnica sencilla y rápida para el aislamiento de MNT en aguas de consumo público.

La técnica de PCR a tiempo real utilizada fue diseñada por Radomski *et al.* (2010) que desarrollaron este método para la detección de *Mycobacterium* spp. a partir de muestras ambientales.

En nuestro estudio, la PCR a tiempo real a partir de muestra directa de agua presenta limitaciones para

la detección de *Mycobacterium* spp., dada la baja sensibilidad encontrada.

Diversos autores indican que el método más sensible para detectar MNT en el agua es el cultivo en MB7H11 agar y posteriormente determinar las especies por métodos de biología molecular (Hussein *et al.* 2009; Klanikova *et al.*, 2013), que es la técnica seguida por nosotros en el estudio anterior ya publicado (Lecuona *et al.* 2016). El cultivo es un método barato de detección de MNT con la desventaja de presentar un tiempo de resultado de aproximadamente entre 4-6 semanas, lo cual retrasa en muchos días el diagnóstico. Sin embargo, la PCR a tiempo real, aunque tiene un tiempo de respuesta de horas, presenta una baja sensibilidad para detectar MNT en las condiciones del estudio y es un método costoso y que requiere de una infraestructura especial en el laboratorio.

Una limitación de este estudio es que no se realizaron cultivos ni PCR cuantificada, por tanto, se desconoce la carga bacteriana presente en las muestras de agua. Por ello, no podemos valorar si las muestras con un número bajo de bacilos reducen la sensibilidad de la técnica molecular. En la actualidad, se desconoce la dosis infectiva mínima de MNT que puede tener implicaciones clínicas. Por tanto, podemos suponer que la PCR utilizada, podría probablemente detectar como positivas aquellas muestras de agua con elevada carga bacteriana de forma rápida (18 a 24h), lo que le haría ser considerada una futura herramienta de screening para los Laboratorios de Salud Pública. Consideramos que es necesario investigar en las ventajas y limitaciones de los métodos para obtener una técnica que permita una identificación rápida y correcta de las especies de micobacterias no tuberculosas en aguas de consumo.

CONCLUSIONES

En nuestro estudio, la PCR a tiempo real a partir de muestra directa de agua presentó una baja sensibilidad para detectar *Mycobacterium* spp. Es necesario seguir profundizando en este tipo de estudios para desarrollar una técnica más sensible, rápida y de bajo costo.

AGRADECIMIENTOS

Los fondos para este proyecto fueron proporcionados por la Fundación Caja-Canarias (Referencia AGUA10 / 2014).

BIBLIOGRAFÍA

- Ashbolt, N.J. 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, E., Delle, S.A., Di Gianfilippo, F., Grassano, L., *et al.* An Italian investigation on non-tuberculous mycobacteria in

- an urban water supply. *Ann. Ig.* 2014; 26 (3): 264–271.
- Bryant, JM., Grogono, D.M., Greaves, D., Foweraker, J., Roddick I., et al. Secuenciación de todo el genoma para identificar la transmisión de *Mycobacterium abscessus* entre los pacientes con fibrosis quística: un estudio de cohorte retrospectivo. *Lancet.* 2013; 381: 1551-1560.
- Crago, B., Ferrato, C., Drews, SJ., Louie, T., Ceri, H., Turner, J., et al. 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.
- Donohue, MJ., Mistry, H., Donohue, JM., O'Connell, K., King, D., Byran, J., et al. Increased frequency of nontuberculous mycobacteria detection at potable water taps within the United States. *Environ. Sci. Technol.* 2015; 49 (10): 6127–6133.
- Falkinham III, J.O. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clin. Chest Med.* 2015; 36 (1): 35–41.
- Fernandez-Rendon, E., Cerna-Cortes, JF, Ramírez-Medina, MA., Helguera-Repetto, AC., Rivera-Gutiérrez, S., Estrada-García, T., González, 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; 80 (1): 74–76.
- Genc, G.E., Richter, E., Erturan, Z. Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital waters in Turkey. *APMIS.* 2013; 121 (12): 1192–1197.
- Hussein, Z., Landt, O., Wirths, B., Wellinghausen, N. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. *Int J Med Microbiol.* 2009; 299(4): 281-90.
- 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; 67 (6): 725–731.
- Lecuona M., Abreu R., Rodríguez-Álvarez C., Castro B., Campos S., Hernández-Porto M., Mendoza P., Arias A. First isolation of *Mycobacterium canariense* from municipal watersupplies in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Int J Hyg Environ Health.* 2016; 219: 48–52.
- 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; 30 (1): 99–107.
- Mirsaeidi, M., Farshidpour, M., Ebrahimi, G., Aliberti S., Falkinham JO. Management of nontuberculous mycobacterial infection in the elderly. *Eur J Intern Med.* 2014; 25 (4): 356-363.
- Mirsaeidi, M., Machado, RF., García, JG., Schraufnagel, DE. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: a population-based comparative study. *PLoS One* 9. 2014: E91879.
- Radomski, N., Lucas, F.S., Moilleron, R., Cambau, E., Haenn, S., Moulin, L.. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Nov; 76(21): 7348-51.
- 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 Clin Microbiol.* 2013a; 51 (9): 3006–3011.
- Thomson, R.M., 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.* 2013b; 13: 89.
- Wingender, J., Flemming, H.C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health.* 2011; 214 (6), 417–423.