

**Uso de la técnica de VNTR-MIRU para el estudio de transmisión intrahospitalaria de tuberculosis en el Hospital Universitario de Caracas, 2010-2011.**

**Use the VNTR - MIRU technique for the study of nosocomial transmission of tuberculosis at the Hospital Universitario de Caracas, 2010-2011**

**Jesús E Vielma V<sup>1,2</sup>, Thailing C Moreno<sup>1</sup>, Omaira J Da Mata J<sup>2,3</sup>, Sandra Fernández S<sup>2</sup>**

1.- Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria Caracas, República Bolivariana de Venezuela 2.-Laboratorio de Diagnósticos Especiales. Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica., Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ciudad Universitaria. Caracas. Teléfono: 58-212-2191737. 3.- Postgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, Caracas.

\* Autor para correspondencia: Vielma.jesus.eduardo@gmail.com

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, causada por especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Es una enfermedad de fácil transmisión, lo que puede generar un problema en los sitios de cuidado de salud al incrementarse el riesgo de infección entre las personas que se encuentran hospitalizadas, personal médico y visitante. El objetivo de este estudio fue tipificar mediante VNTR-MIRU 35 aislados de *M. tuberculosis*, obtenidos de pacientes recluidos en el Hospital Universitario de Caracas (HUC) durante 2010–2011, para establecer si existe estrecha relación genética entre los aislados y detectar si se presentó transmisión intrahospitalaria. En la tipificación por VNTR se observaron 29 patrones genéticos únicos (82,9%) y 3 clústeres, de los cuales sólo uno estuvo conformado por patrones genéticos de aislados provenientes de pacientes con estrecha relación epidemiológica (superposición de períodos de hospitalización). Mediante el análisis comparativo de los patrones genéticos con los depositados en la base de datos de VNTR-plus utilizando el método de Neighbor-joining, se pudo observar que los aislados se agrupaban con patrones LAM (n=25), Haarlem (n=3) y S (n=7). La conformación de un clúster de dos aislados de pacientes con un vínculo epidemiológico sugiere la posible transmisión nosocomial de la TB en el HUC

**Palabras Claves:** Tuberculosis, tipificación molecular, VNTR-MIRU, transmisión intrahospitalaria, epidemiología.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease, caused by species from the *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC). It is an easily transmitted disease that it can increase the risk of infection among people who are in hospital, medical staff and visitors. The purpose of this study was to molecular typing by VNTR-MIRU 35 isolates of *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)* from hospitalized patients in the "Hospital Universitario de Caracas" during 2010-2011 to establish whether there is a close genetic relationship between isolates and to detect whether the nosocomial transmission was presented. In the analysis of VNTR typing, 29 unique genetic patterns (82,9%) and 3 *clusters* were observed, of which only one consisted by genetic patterns of isolates from patient with close epidemiologic relation (overlapping of periods of hospitalization). With the comparative analysis of genetic patterns with VNTR-plus database using Neighbor-joining method it was possible to observe the clustering of the isolates with LAM (n=25), Haarlem (n=3), S (n=7). The forming of one cluster with two isolates from patients with epidemiological link suggests a possible nosocomial transmission of TB in HUC.

**Key words:** Tuberculosis, molecular typing, VNTR-MIRU, nosocomial transmission, epidemiology.

## INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es causada por bacilos ácido resistentes pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)*. Está catalogada como la enfermedad infecciosa más prevalente del mundo. Según la OMS en el año 2013 se presentaron 10.000 casos de TB en Venezuela (1). Afecta a todos por igual, no reconoce edad, sexo, raza o condición social, pero está estrechamente ligada a la pobreza, personas que viven en zonas endémicas y hacinamiento (2). Son más susceptibles de desarrollar la enfermedad todas aquellas personas con un sistema inmunológico debilitado, como es el caso de las personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (3). Aunque la TB puede afectar todos los órganos y tejidos, es una enfermedad principalmente pulmonar (4).

La forma pulmonar de la TB es la principal fuente de contagio, ya que en este momento se transmiten los bacilos vivos de una persona a otra, al hablar, toser o escupir, siendo su fácil transmisión el principal problema de salud pública (5). El fácil contagio de la TB ha generado preocupación en los sitios de cuidado de salud al verse aumentado el riesgo de infección entre las personas que se encuentran hospitalizadas y al personal de salud. Se ha demostrado un incremento de los casos de TB dentro de los recintos hospitalarios, lo que se podría deber a la tardanza en el diagnóstico de la infección (6).

Típicamente, la transmisión intrahospitalaria de TB se ignora, pero varios factores ilustran que la TB nosocomial debe abordarse. En primer lugar, la transmisión intrahospitalaria es motivo de preocupación, ya que afecta no solo a los pacientes que están expuestos, sino también al personal de salud, lo que podría afectar negativamente a los servicios sanitarios a través del tiempo (7). En segundo lugar, la transmisión de la TB puede tener graves consecuencias, en particular con la TB multirresistente (TB-MDR). Varios brotes en Estados Unidos demostraron el papel que pueden jugar los hospitales como focos de la transmisión de TB-MDR (8), un fenómeno que también se observó en Europa (9), América del Sur (10) y Rusia (11). Estos brotes pueden ser explosivos y se asocian con altas tasas de mortalidad ya que los pacientes hospitalizados a menudo son inmunocomprometidos (12).

El riesgo de transmisión intrahospitalaria es directamente proporcional a la prevalencia de TB en la comunidad y varía según el tipo de hospital y, dentro del mismo, del área de que se trate. A pesar de la prevalencia moderada de la TB en Venezuela y la probabilidad esperada de la transmisión intrahospitalaria, se sabe poco acerca de la TB nosocomial. Para la realización de este estudio se seleccionó

el Hospital Universitario de Caracas (HUC), que podría considerarse como una institución con riesgo intermedio de transmisión nosocomial de TB, pues atiende un gran número de pacientes con diagnóstico de TB referidos de otros centros de salud de la ciudad de Caracas y del interior del país (13). En esta investigación se analizaron diversos aislados de *M.tb*, que fueron obtenidos a partir de muestras de pacientes hospitalizados en el HUC, entre 2010 y 2011, mediante la comparación de patrones genéticos utilizando VNTR-MIRU, para establecer si existe relación genética entre ellos y detectar si se presentó transmisión intrahospitalaria de TB en este recinto.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En el Laboratorio de Diagnósticos Especiales del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) en el año 2010 se recibieron muestras de 342 pacientes y se diagnosticaron 37 pacientes positivos para TB; en el año 2011 se recibieron un total de 386 pacientes de los cuales 54 pacientes se diagnosticaron con TB, de estos, se seleccionaron un total de 35 muestras provenientes de pacientes con aparente relación epidemiológica dentro del hospital o con hospitalizaciones previas en el mismo., referidas del HUC, durante el período 2010-2011. El HUC se encuentra ubicado en la Universidad Central de Venezuela (UCV), consta de 52 servicios en los cuales se realiza el diagnóstico y se da tratamiento a pacientes con TB, principalmente en los servicios de Neumología y de Enfermedades Infecciosas del Adulto y de Niños.

### **Aislados bacterianos y cepas controles**

De los 98 aislados de *M.tb*, referidos, se seleccionaron para el análisis 35 (24 muestras de esputo, 8 lavados bronquiales, 2 ganglios y 1 líquido pleural), que pertenecían a pacientes hospitalizados y/o con hospitalización previa. El rango de las edades de los pacientes fue de 17 a 84 años, con una mediana de 35 años. Los pacientes provenían de diversos estados del país: Anzoátegui (n=1), Distrito Capital (n=19), Guárico (n=1), Miranda (n=13) y Vargas (n=1). De los aislados analizados, 17 fueron obtenidos en el año 2010 y 18 en el 2011. La información sobre la reactividad anti VIH se conoce en 19 de los pacientes, de los cuales 18 fueron positivos. En relación con la localización dentro del recinto hospitalario, los pacientes provenían de los servicios de Enfermedades Infecciosas del Adulto (n=13), Emergencia (n=2), Medicina Interna (n=6) y Neumología (n=14). Como cepa control se utilizaron *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *Mycobacterium bovis* BCG.

## Tipificación mediante VNTR-MIRU

Los aislados se conservaron en caldo tripticasa de soya con 20% de glicerol a -70 °C, a partir de los cuales se realizaron subcultivos en medio Loweinstein-Jensen y se incubaron a 37 °C hasta observarse el desarrollo bacteriano. Luego se realizó la extracción de ADN mediante ebullición con buffer TE (Tris-HCl 1M y EDTA 1 M pH 8), durante 10 min. Se centrifugó a 17.000 g por 3 minutos. Posteriormente el sobrenadante se diluyó 1/10 con el buffer TE y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para realizar la tipificación molecular se emplearon los 24 *loci* de VNTR (del inglés: Variable Number Tandem Repeat), siguiendo el protocolo estandarizado por Supply y colaboradores (14). La comparación de los patrones genéticos de los aislados se realizó mediante el método UPGMA (del inglés: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Posteriormente se compararon los patrones genéticos obtenidos con los disponibles en la base de datos de VNTR-Plus con el método *Neighbor Joining*, para la identificación de los posibles linajes (14).

## RESULTADOS

De los 35 aislados analizados, 29 corresponden a patrones únicos y solo se agruparon seis aislados en tres clusteres (Figura 1). El cluster A agrupó los aislados número 34 y 7 provenientes de dos pacientes hospitalizados en periodos y servicios distintos (mayo del 2010 en el Servicio de Emergencia y Diciembre del 2011 en enfermedades infecciosas del adulto, respectivamente), ambos pacientes VIH positivo y con zona de residencia en la Ciudad de Caracas (El Valle y el Hatillo, respectivamente). El clúster "B" está conformado por dos aislados, números 27 y 4 provenientes de pacientes que residen en el estado Miranda, pero que estuvieron hospitalizados en fechas distintas (abril 2010 y agosto 2011). Al contrario de lo observado en los clúster "A" y "B"; el clúster C agrupa dos aislados, números 5 (mujer de 26 años) y 6 (hombre de 27 años), hospitalizados en la misma sala de enfermedades infecciosas del adulto, entre los últimos días del mes de abril y los primeros días del mes de mayo del 2010, ambos con diagnóstico de inmunosupresión (VIH+), que provenían del estado Miranda, y presentaron la forma pulmonar de TB con una alta carga bacilar en esputo confirmada con baciloscopia de dos y tres cruces respectivamente.

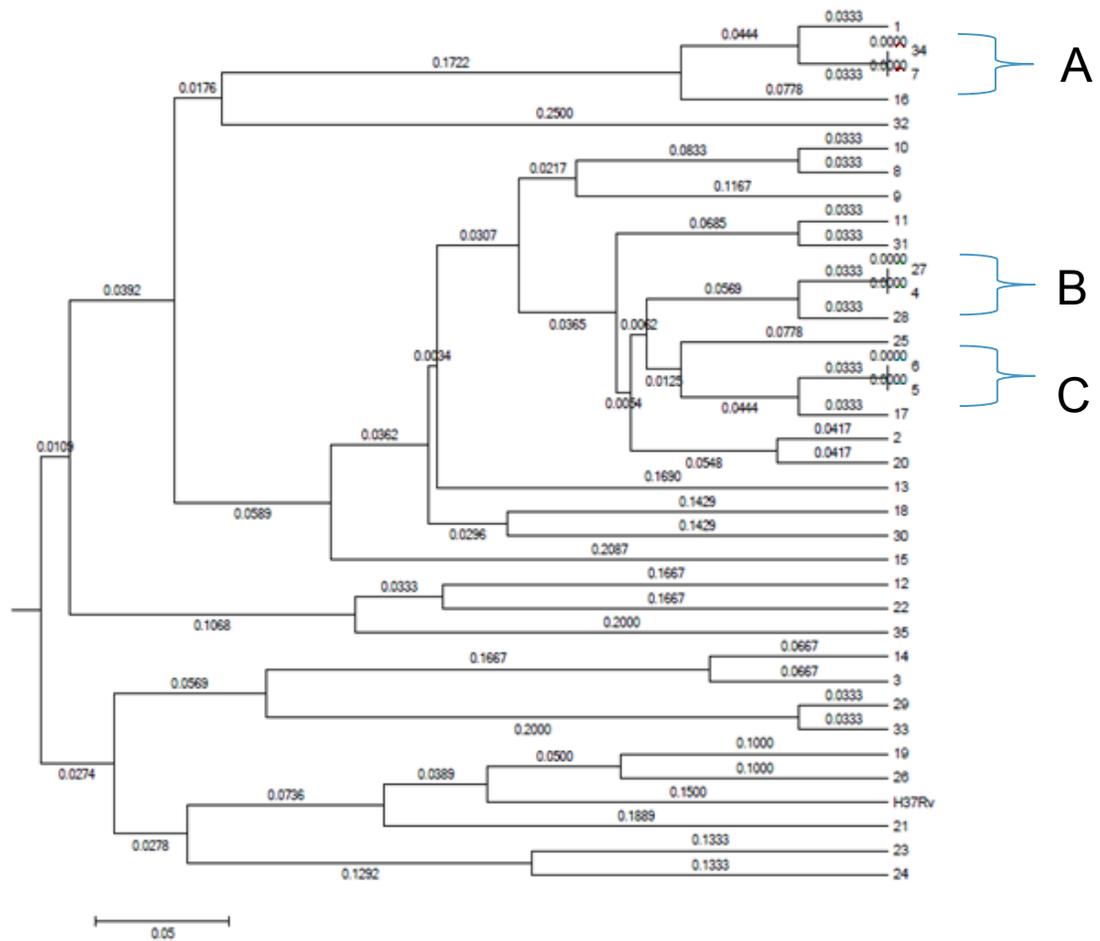


Figura 1. Dendrograma obtenido a través de análisis comparativo de los patrones genéticos de VNTR de 35 aislados de muestras de paciente hospitalizados de HUC. La comparación se realizó mediante el método UPGMA. Los clúster se indican con la letra A, B y C.

En el análisis comparativo de los patrones genéticos de VNTR-MIRU mediante el método Neighbor-Joining se observó un agrupamiento de los aislados con patrones pertenecientes a los linajes Harlem (n=3), S (n=7) y LAM (n=25) (Figura 2).



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El riesgo de transmisión de *M.tb* desde un paciente con TB activa a otro paciente o al personal de salud se ha reconocido desde hace varios años. El nivel de riesgo varía por el entorno, ocupación, población de pacientes y las medidas para el control de la TB. El riesgo es mayor en aquellas instituciones que manejan un gran número de pacientes bacilíferos que no reciben un diagnóstico rápido, aislamiento y tratamiento, sobre todo en los entornos de atención terciaria. Aunque la prevalencia de TB en Venezuela es moderada, con tasa global de alrededor de 29 por 100.000 habitantes (1), poco se conoce sobre la TB nosocomial en el país.

La identidad de genotipos de los aislamientos de *M. tb* es el mejor método para confirmar la sospecha de transmisión. La transmisión reciente se asume cuando se obtienen diversos aislamientos de *M. tb* que tienen huellas de ADN idénticas o muy similares, que se denominan "aislamientos en agregaciones" o "clúster". Cuando, por el contrario, se aíslan patrones únicos de ADN, se considera en general que se debe a la reactivación de una infección adquirida en un momento distinto (15,16).

Mediante el análisis de los patrones genéticos de los 35 aislados con el método Neighbor-Joining y los patrones almacenados en la base de datos de VNTR plus se observó el agrupamiento de 25 aislados con el linaje LAM (latinoamericana-mediterráneo), 3 aislados con el linaje Haarlem y 7 aislados con el linaje S, el cual es de baja frecuencia en Venezuela, tal y como lo indican Sequera y colaboradores (17). En un estudio en el estado Carabobo en el que reportaron los patrones de espiligotipaje de 317 aislados de *M. tb* provenientes de los diferentes distritos sanitarios, los autores reportaron un total de 121 patrones, agrupándose 220 aislados en 24 clústeres y 97 aislados con patrones únicos. Los espiligotipos encontrados con mayor frecuencia fueron los siguientes; LAM: 49%, T 16.3%, Harlem 14%, S 4.7%, X 2.3%, Beijing 2.3% y linaje desconocido (17).

La epidemiología de la TB en ciertos grupos específicos de pacientes como los que utilizan drogas inyectadas, los infectados con VIH, los pertenecientes a etnias amerindias o los privados de libertad, puede diferir de la que se observa en los pacientes sin estas características de áreas urbanas y rurales. Esto lo demuestra el estudio realizado por Iñigo Martínez y col. (18), donde utilizaron RFLP IS6110 y espiligotipaje para determinar la relación en 233 aislados de TB en un área sanitaria de Madrid, el grupo más numeroso estaba conformado por 134 aislados con patrones genéticos de RFLP únicos. Entre los casos agrupados se detectaron

dos patrones de transmisión; en el primero, los aislados que provenían de 57 pacientes agrupados en 23 clústeres, de los cuales 25 aislados eran de pacientes que tenían vinculación epidemiológica; el segundo grupo lo formaban 42 pacientes agrupados en 6 clústeres (5-6 pacientes por clústeres); de los cuales el 28,6% de estos pacientes usaba drogas inyectadas, el 31% estaba infectado con HIV y el resto estuvo en prisión. Esta particularidad pudiera impactar en los resultados obtenidos en los clústeres con sospecha de transmisión nosocomial de TB, pues tanto en el clúster "A", como en el clúster "C", los pacientes son VIH positivo.

Cuando los aislamientos de dos o más pacientes presentan genotipo no diferenciables se asume que esos casos en "clúster" integran una misma cadena de transmisión. Los clústeres "A" y "B" están conformados por aislados obtenidos de pacientes sin aparentemente riesgo de infección durante su estancia en el hospital. A diferencia del *cluster* "C" que se conformó por aislados de pacientes que tienen antecedentes de exposición hospitalaria simultánea. Aunque, con los datos epidemiológicos disponibles no es posible descartar por completo la transmisión fuera del recinto hospitalario, por ser ambos pacientes residentes de la misma área geográfica, adicional al hecho que la enfermedad actual puede ser el resultado de reactivaciones de infecciones pasadas consecuencia de la co-infección TB/VIH, al coincidir la hospitalización en el mismo servicio médico del Hospital, durante el mismo periodo de tiempo, se sustenta la hipótesis de transmisión intrahospitalaria de la TB en el HUC en estos dos pacientes, ya que no se conocen otros datos epidemiológicos que indiquen que la transmisión fue fuera del recinto hospitalario.

Cerezo y col (19) indican que el poder discriminatorio de MIRUs-VNTR está un poco por debajo de RFLP IS6110, índice discriminatorio de Hunter Ganston (GDHI) 0,983, sin embargo, no presenta las desventajas que tiene la RFLP IS6110, en cuanto a la necesidad de un número de copias del fragmento de inserción mayor a cinco, ni a lo laboriosa de la misma, además, indican que el poder discriminatorio puede ser aumentado de acuerdo al número de locus de VNTR que sean utilizados, y cuando se utiliza en conjunto con spoligotipiaje el poder discriminatorio aumenta considerablemente: Estos autores utilizando VNTR con 12 locus demostraron la infección policlonal en un paciente VIH positivo, encontrando 3 diferentes patrones genéticos en una misma muestra, demostrando la utilidad de la técnica de VNTR-MIRU para detectar infecciones causadas por diferentes cepas de TB; en nuestro estudio no se detectó ninguna infección policlonal.

Varios factores pueden facilitar la transmisión nosocomial en el HUC, aunque su importancia relativa en la facilitación de la transmisión es desconocida. El manejo de una cantidad significativa de pacientes con TB y exposiciones repetidas a pacientes con TB con baciloscopia positiva es probable que sean factores críticos. Los retrasos en el diagnóstico y el inicio del tratamiento y el fracaso para separar o aislar pacientes con TB con baciloscopia positiva de otros pacientes contribuyen al riesgo de transmisión. Los resultados de este estudio nos demuestran un bajo porcentaje de agrupamiento en clústeres, de sólo el 5.7%, lo cual nos indica que a pesar de que el HUC es una institución que recibe una gran cantidad de pacientes con TB, la transmisión de la misma no es tan frecuente. En las salas de hospitalización del HUC, el manejo del aire es predominantemente por ventilación natural, esta forma de ventilación permite recambios de aire con la consiguiente disminución del riesgo. Por ejemplo, en un estudio reciente, Escombe y col (20) evaluaron en Perú, la ventilación natural en las salas de ocho hospitales de la ciudad de Lima. Los edificios más antiguos tenían techos más altos y poseían mayores niveles de ventilación espontánea cuando fueron comparados con edificios más nuevos con techos más bajos (40 *versus* 17 recambios por hora con puertas y ventanas abiertas). El riesgo de contagio estimado fue de 97% en las personas susceptibles en una sala llena de pacientes con TB bacilífera, antes del tratamiento y sin ventilación, de 33% en salas de hospitales nuevas y de 11% en las salas de hospitales más viejos. Estos datos señalan que las edificaciones antiguas, como es el caso del HUC, ofrecen cierto nivel de protección cuando se acostumbra a ventilar las salas que albergan pacientes con TB (20).

En nuestros hospitales públicos asisten gran cantidad de pacientes con recursos siempre insuficientes, se debería aumentar la conciencia del riesgo y el conocimiento de medidas simples y de muy bajo costo para mejorar la seguridad como la ventilación, la desinfección y limpieza de áreas, y la protección del personal de salud. En síntesis, la prevención de la TB intrahospitalaria descansa en el reconocimiento precoz de los casos para su aislamiento y tratamiento, y las medidas óptimas para minimizar la transmisión de la TB. Además, es importante resaltar que la técnica de VNTR-MIRU resulta una excelente herramienta epidemiológica que permite establecer patrones de transmisión en conjunto con la epidemiología clásica y de esta manera establecer relación entre los pacientes.

## AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Alejandro Angulo y al Sr. Richard Aparicio por su gran ayuda, colaboración y soporte durante la realización de este trabajo de investigación, y al Departamento de Reactivos y Medios de Cultivos. Este trabajo fue financiado por la Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.

## REFERENCIAS

1. WORDL HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION. [Online].. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.1320?lang=en>. (cited 2015 Julio 12)
2. Kurt t. Tuberculosis, detección de casos, tratamiento y vigilancia. 2ª ed. Washington DC: OPS; 2006.
3. Fernando A. Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29(1): 493-495.
4. Fanlo P, Tiberio G. Tuberculosis extrapulmonar. Anales Sistema Sanitario de Navarra. 2007; 30(2):143-162.
5. Rodriguez de L Maria L, Naranjo Maria M, Perez Z Aurora. Prevención y control de la tuberculosis en trabajadores del ámbito sanitario. Instituto de Salud Carlos III -Ministerio de Ciencias e innovación. 2009. Monografía Disponible en <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=14/09/2012-46db82522e>, (Consultado el14 nov 2016).
6. Gonzalo X, Ambroggi M, Cordova E, Brown T, Poggi S, Drobniewski F. Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis, Buenos Aires, Argentina. Emerging Infectious Diseases. 2011; 17(3): 528-531.
7. World Health Organization. Guidelines for the prevention of tuberculosis in health care facilities in resource-limited settings. World Health Organization; 1999.

8. Beck-Sague C, SW Dooley, MD Hutton, J Otten, A Breeden, JT Crawford, et al. Hospital outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. JAMA. 1992; 268: 1280–6.
9. Moro M, Gori A, Isabella E, Infuso A, Franzetti F, Sodano L, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. AIDS. 1998; 12: 1095-102.
10. Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, Dambrosi A, Lopez B, Isola N, N de Kantor I. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus–related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. Oxford journal. 1997; 176: 637–42.
11. Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetsov S, Zakharova S, Melentyev A, Fedorin I. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia.. JAMA. 2005; 293: 2726–31.
12. Blumberg HM, Watkins DL, Berschling JD, Antle A, Moore P, White N, et al. Preventing the nosocomial transmission of tuberculosis. Annals of Internal Medicine: Journal. 1995; 122: 658–63.
13. CDC. Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health care facilities. Morbidity and Mortality Weekly Report. 1994 October; 43 (RR-13): 1-133.
14. Supply P. MIRU-VNTR Plus. [Online].; 2005. Available from: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces>. (cited 2012 Noviembre 15)
15. NGUYEN L. N, GILBERT G. L, MARKS GB. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. Respirology. Respirology. 2004; 9: 313-9.
16. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. Journal of Internal Medicine. 2001; 249: 1-26.

17. Sequera MC, Delgado VS, Araque WMyc. Mycobacterium tuberculosis: Espoligotipos en el Estado Carabobo, Venezuela. Revista Chilena de Infectología. 2008 Junio; 25(5): 362-367.
18. Iñigo Martínez Jesús, Arce Arnáez Araceli, Chaves Sánchez Fernando, Palenque Mataix Elia, Burgoa Arenales Mar. Patrones de transmisión de la tuberculosis en un área sanitaria en Madrid. Revista española de salud pública. 2003 octubre; p. 541-551.
19. Cerezo Cortés María Irene. Tipificación de aislados clínicos de Mycobacterium tuberculosis obtenidos en Bogotá mediante la técnica molecular MIRUs VNTR Bogotá: Tesis de maestría; 2009.
20. Escombe AR, Oeser CC, Gilman RH, Navincopa M, Ticona E, Pan W, et al. Natural ventilation for the prevention of airborne contagion. Plos Med. 2007; (4): 309-17.

Recibido: 17 d julio de 2017

Aprobado: 07 de noviembre de 2017