

# Caracterización genotípica de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de muestras clínicas de personas privadas de la libertad en una cárcel de Córdoba, Argentina.

**Autores:**

Bioq. Davor Nicolás Martinovic<sup>1</sup>  
Méd. microbióloga Lidia Wolff<sup>1,2</sup>  
Dra. Ana María Littvik<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> División Microbiología, Hospital Rawson. Córdoba. Argentina.

<sup>2</sup> Cátedra de Clínica Infectológica I Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

<sup>3</sup> Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas – Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

**Autor principal:**

Bioq. Davor Nicolás Martinovic  
Antonio Rosillo 59,  
barrio San Ignacio, Córdoba.  
davornm@gmail.com

(0351) 152655937

**Resumen**

Resumen: La tuberculosis (TB) sigue siendo una enfermedad frecuente y grave en el Siglo XXI. Las cárceles son instituciones con altos números de casos de TB debido a sus condiciones de higiene y habitabilidad. El conocimiento acabado de las cepas circulantes en las cárceles puede colaborar al mayor entendimiento y control de la enfermedad. Se realizó un estudio descriptivo, observacional, transversal y retrospectivo. Se incluyó en el muestreo ocho cepas de *Mycobacterium tuberculosis* recuperadas de muestras clínicas de personas privadas de la libertad en la cárcel de Bouwer, Córdoba, Argentina y atendidas en el Hospital Rawson de Córdoba en el período desde enero de 2010 hasta julio de 2017. Se realizó examen directo y cultivo de las muestras en el Laboratorio de la División Microbiología del Hospital Rawson de Córdoba. La identificación de género y especie se condujo en el Laboratorio Regional de la Tuberculosis, Hospital Tránsito Cáceres de Allende, Córdoba. La genotipificación se realizó en el Servicio Micobacterias de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" (A.N.L.I.S.), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Cuatro cepas tuvieron un 100% de homología entre sí, una cepa estaba altamente relacionada con las anteriores y tres cepas correspondían a genotipos no relacionados con los primeros ni entre sí. Es necesario ampliar el número de aislamientos estudiados y realizar un estudio epidemiológico profundo a los fines de poder trazar la cadena epidemiológica de la TB dentro de la cárcel a fin de optimizar los programas de control de la

enfermedad en esa población.

**Abstract:** Tuberculosis (TB) is still a frequent and serious disease in the XXI century. Jails are institutions with elevated numbers of TB cases due to their poor hygiene and living conditions. Deep knowledge of the circulating strains can contribute to a better understanding and control of the disease. A descriptive, observational, transversal and retrospective study was conducted. Eight *Mycobacterium tuberculosis* strains recovered from clinical samples of people deprived of freedom in the prison of Bouwer, Córdoba, Argentina and attended at Hospital Rawson between January 2010 and July 2017. Direct examination and culture were performed at Hospital Rawson's microbiology laboratory. Gender and species identification was performed at Laboratorio Regional de la Tuberculosis, Hospital Tránsito Cáceres de Allende, Córdoba. Genotyping was conducted at Servicio Micobacterias, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" (A.N.L.I.S.), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Four strains had 100% identity, one strain was highly related to the previous ones and three strains had genotypes doesn't related with themselves and the others. It is necessary to expand the number of analyzed strains and perform a deep epidemiologic study to be able to trace the epidemiological chain of TB in jail and optimize the control programs for that population.

**Introducción:** La tuberculosis (TB) en el siglo XXI sigue siendo una enfermedad frecuente y grave a pesar de ser bien conocida, poder ser prevenida y existir técnicas de diagnóstico y tratamiento efectivas<sup>1</sup>. Afecta principalmente a grupos económicamente desfavorecidos y socialmente marginados por lo que su tasa de incidencia es muy elevada en países y regiones de escasos recursos, especialmente en las grandes ciudades e instituciones cerradas<sup>2</sup>.

Las cárceles son reconocidas internacionalmente como instituciones con alto número de casos de TB donde la transmisión está determinada por el contacto entre internos, personal y/o contactos externos enfermos con otros sanos<sup>2,3,4</sup>. El hacinamiento, la mala ventilación, la falta de exposición a la luz natural y, en muchos casos, la falla en la implementación de programas institucionales efectivos de control de la TB en este tipo de instituciones constituyen factores determinantes para la propagación de la enfermedad en el ámbito carcelario<sup>5,6,7</sup>.

La incidencia de TB en prisiones de América Latina es 22,2 veces mayor que en la población general lo cual las constituye en sitios de reservorio, concentración y diseminación de la enfermedad<sup>5,8</sup>.

El acabado conocimiento de las cepas de *M. tuberculosis* circulantes en las cárceles, así como el mejoramiento de las condiciones de reclusión y la correcta implementación de programas institucionales de control y manejo de la TB pueden colaborar en la contención de la enfermedad tanto en los centros penitenciarios como en las comunidades en que se enclavan<sup>9,10</sup>.

La genotipificación de los aislamientos de *M. tuberculosis* contribuye al establecimiento de vínculos epidemiológicos entre cepas, detectando posibles brotes no sospechados, contaminación cruzada en el laboratorio y distinguiendo entre reactivaciones de la enfermedad y posibles reinfecciones<sup>11</sup>.

En las últimas décadas se utilizó como gold standard para la tipificación genotípica de cepas de *M. tuberculosis* la técnica de detección de polimorfismos en el largo del fragmento de restricción IS6110 (IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism -RFLP-), secuencia de nucleótidos altamente conservada en la especie y reconocible por enzimas de restricción (endonucleasas), permitiendo detectar las diferencias entre linajes<sup>12</sup>. Sin embargo, esta técnica de amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction -PCR-) seguida de digestión de los fragmentos de ADN mediada por enzimas de restricción que cortan las hebras de material genético escindiendo las regiones IS6110 para su posterior estudio, posee grandes limitaciones en cuanto a tiempos de reacción y purificación que pueden llevar semanas, con un intensivo trabajo en el laboratorio y alta complejidad en la interpretación de los resultados de los patrones de bandas obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa<sup>11</sup>.

La genotipificación basada en números variables de repeticiones en tándem (Variable Numbers of Tandem Repeats -VNTR-) de diferentes clases de elementos genéticos intercalados en el ADN micobacteriano, llamados unidades repetitivas intercaladas micobacterian-

as (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units -MIRUs-), es utilizada cada vez con mayor frecuencia para evitar las dificultades de la RFLP<sup>13</sup>. Esta técnica mixta se basa en la amplificación de múltiples elementos genéticos del ADN bacteriano mediante la combinación con sondas de hibridación (primers) específicas y la posterior determinación del tamaño de los amplicones mediante electroforesis en capilares o geles o mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (High Performance Liquid Chromatography -HPLC-) <sup>11</sup>. Esta flexibilidad en la técnica sumada a la posibilidad de trabajar con extractos crudos (sin necesidad de digestión mediante enzimas de restricción) de colonias nacientes en los cultivos la vuelven considerablemente más rápida que la técnica de RFLP. Asimismo, la interpretación de los resultados es menos dificultosa ya que se obtienen códigos numéricos asociados a cada primer utilizado y la comparación se torna más sencilla<sup>14</sup>.

Adicionalmente, la tipificación genotípica basada en la detección de espaciadores de oligonucleótidos (Spacer Oligonucleotide Typing -Spoligotyping-) es una técnica de PCR rápida y precisa orientada a la detección de un locus cromosómico específico, la región "Direct Repeat" (DR), presente únicamente en las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En la especie *M. tuberculosis* la región DR se compone de 36 pares de bases separadas por 43 espaciadores altamente conservados. Mediante la utilización de primers específicos dirigidos a la región DR se produce la primera amplificación de los espaciadores. Los oligonucleótidos obtenidos (marcados con moléculas de biotina) son fijados mediante hibridación a una membrana activada con oligonucleótidos complementarios de secuencia conocida. Posteriormente esta membrana es incubada en una solución de estreptavidina-peroxidasa. La combinación de biotina y estreptavidina produce la liberación de una señal luminica que puede ser detectada por autorradiografía o quimioluminiscencia. De este modo se obtiene a partir de la membrana un patrón de puntos de hibridación que es comparado con un patrón de los 43 espaciadores conocidos, detectando la presencia o ausencia de aquellos y permitiendo determinar el linaje de la cepa en estudio<sup>15</sup>.

Los datos obtenidos mediante ambas técnicas de genotipificación pueden ser ingresados en bases de datos internacionales para su análisis e interpretación. Shared International Type (SIT) es una base de datos online mundial de marcadores moleculares de cepas de *M. tuberculosis*<sup>16</sup> que otorga una clasificación o "tipo" de cepa y permite identificar a qué linaje pertenece. Fue creada en el año 1997 y cuenta con más de 87.000 aislamientos catalogados, provenientes de 160 países. Esta información es fundamental a la hora de trazar la evolución y epidemiología de la transmisión de la enfermedad y de conocer los linajes prevalentes y emergentes en cada región para proyectar futuras expansiones.

De esta manera, la combinación de técnicas rápidas y de sencilla aplicación permite la identificación genotípica de cepas de *M. tuberculosis* con alta especificidad y precisión. El objetivo del presente trabajo es caracterizar genotípicamente las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas

de muestras clínicas de personas privadas de la libertad en una cárcel de la Provincia de Córdoba, Argentina.

**Materiales y método:** se realizó un estudio descriptivo, observacional, transversal y retrospectivo. Se incluyó en el muestreo ocho cepas de *M. tuberculosis* aisladas de muestras clínicas de personas privadas de la libertad (PPL) en la Penitenciaría de Bouwer, Córdoba y atendidas en el consultorio de Tuberculosis del Hospital Rawson de la ciudad de Córdoba en el período comprendido entre enero de 2010 y julio de 2017. Las muestras estudiadas fueron siete esputos y una biopsia de ganglio cervical. Los datos se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes, de los registros de la sección Micobacterias del Laboratorio de Microbiología del Hospital Rawson y de los registros del consultorio de Tuberculosis del mencionado Hospital

Los aislamientos fueron obtenidos mediante cultivo en medio sólido de Lowenstein Jensen en el Laboratorio de la División Microbiología del Hospital Rawson. Previamente, a todas las muestras se les realizó examen directo (baciloscopia) mediante coloración de Ziehl-Neelsen, obteniendo resultados positivos en la totalidad de los casos. Las cepas obtenidas fueron identificadas a nivel de especie en el Laboratorio Regional de la Tuberculosis mediante pruebas bioquímicas de niacina, reducción de nitratos y catalasa.

Las cepas de *M. tuberculosis* en estudio fueron derivadas (mediante el sistema de derivación del área de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba) al Servicio de Micobacterias de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, donde se realizaron los análisis genotípicos mediante las técnicas de MIRU-VNTR y Spoligotyping.

Se excluyó del muestreo aquellas cepas de las cuales no se obtuvo datos precisos de sitio de aislamiento, estado de privación de la libertad del paciente, fecha de atención médica, identificación y genotipificación.

Las variables en estudio fueron los patrones de tipificación de cepas mediante las técnicas de MIRU-VNTR y Spoligotyping, la familia o linaje a la que pertenecen los aislamientos y su clasificación dentro de la base de datos Shared International Type (SIT) en base a los resultados de ambos métodos de genotipificación.

Los autores del trabajo se comprometieron a mantener la confidencialidad de los datos y de los pacientes y el mismo contó con la aprobación del Comité de Capacitación y Docencia del Hospital Rawson.

**Resultados:** ocho cepas de *M. tuberculosis* fueron analizadas mediante las técnicas de MIRU-VNTR 15 (analizando 15 unidades de repetición) y Spoligotyping 43 para su tipificación genotípica.

Los aislamientos de cuatro pacientes presentaron patrones con 100% de identidad mediante la técnica de MIRU-VNTR y tres mediante los dos métodos complementarios de genotipificación (no fue posible realizar Spoligotyping a una de las cepas). Un quinto paciente presentó un patrón altamente relacionado con los anteriores en el

análisis con las dos técnicas, pudiendo establecerse homología con las cepas anteriores. Los aislamientos de los otros tres pacientes presentaron genotipos no relacionados con los anteriores y entre sí mediante las dos técnicas de análisis (Fig. 1).

La inclusión de los datos genotípicos en bases de datos SIT confirmó que cuatro de las cinco cepas homólogas pertenecen a un mismo tipo y linaje (34 y S respectivamente) y demostró la ausencia de homología con las tres restantes. Al no poder realizarse Spoligotyping a una de las cepas no fue posible ingresar los marcadores moleculares en la base de datos por lo cual no se obtuvo los resultados de tipo y linaje correspondientes.

**Discusión:** El número de aislamientos analizados fue reducido, debido principalmente a la dificultad en la recuperación de las cepas derivadas para su identificación y realización de pruebas de sensibilidad y, en menor medida, a la escasez de recursos económicos para la realización de las técnicas de biología molecular. Asimismo, el período de estudio fue reducido dado a que aislamientos previos no fueron conservados luego de remitidos para pruebas de identificación y sensibilidad. MIRU-VNTR y Spoligotyping demostraron ser técnicas efectivas para la determinación de los marcadores moleculares requeridos para la tipificación genética de cepas de *M. tuberculosis*, aunque se evidenció la necesidad de contar con ambos métodos de manera complementaria a los fines de determinar el tipo y linaje de cada aislamiento. Del mismo modo, la base de datos SIT resultó un apoyo fundamental en la interpretación de los datos y la determinación de linaje de las cepas, confirmando el grado de homología entre ellas.

El presente trabajo posee gran relevancia ya que no existen a la fecha publicaciones similares en Argentina u otros países.

Es necesario ampliar el número de cepas estudiadas y asociar los resultados a estudios epidemiológicos más profundos para poder determinar la cadena de transmisión y la prevalencia de los distintos linajes dentro de la institución carcelaria. Esto permitiría poseer un mejor entendimiento de la situación de la TB dentro de la cárcel y ser puntapié de la optimización de los programas de control de la enfermedad en esa población mediante políticas sanitarias y habitacionales apropiadas.

#### Agradecimientos

- Al equipo del Servicio Micobacterias de la A.N.L.I.S "Dr. Carlos G. Malbrán" por su invaluable y desinteresada colaboración en la realización de las pruebas de tipificación genotípica y en el aporte de material científico y técnico de primer nivel para la confección del marco teórico.
- Al equipo de la División Microbiología del Hospital Rawson por su apoyo en la búsqueda de información y datos y en la tarea diaria de trabajo.
- Al equipo de atención de Tuberculosis del Hospital Rawson por su incansable tarea en pos de una mejor atención de los pacientes garantizando la calidad y

vocación de servicio dentro del Sistema público de Salud.

El presente trabajo no contó con apoyo económico ni material directo, a excepción de las colaboraciones realizadas por los Institutos de Salud que se mencionan.

La investigación contó con la aprobación del Comité de Capacitación y docencia del Hospital Ramón y los autores se comprometieron a preservar la identidad de los pacientes y la confidencialidad de los datos, confiable a los pacientes.

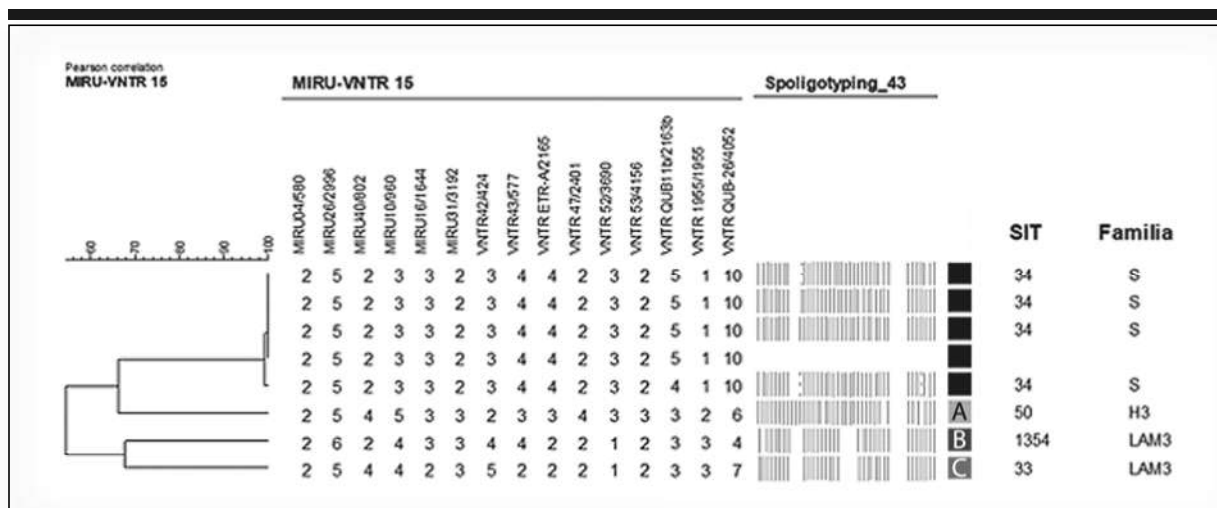


Fig. 1: Correlación genotípica entre cepas de *M. tuberculosis* analizadas mediante MIRU-VNTR y Spoligotyping. 15 marcadores fueron estudiados mediante MIRU-VNTR y 43 espaciadores mediante Spoligotyping, obteniendo alta homología entre 5 aislamientos (cuadros negros) y ausencia de homología en otros 3 (cuadros A, B y C) SIT corresponde a la clasificación dentro de bases de datos internacionales. Familia representa el linaje dentro del que se ubica la cepa.

**Referencias**

- 1- "Global tuberculosis report". Organización Mundial de la Salud. 2019.
- 2- "El control de la tuberculosis en prisiones. Manual para Directores de Programas". Organización Mundial de la Salud. Barcelona, España. 2002.
- 3- "Prevention and Control of Tuberculosis in Correctional and Detention Facilities: Recommendations from CDC". Morbidity and mortality weekly report (MMWR). Centers for Disease Control and Prevention. Vol. 55. 2006.
- 4- "Programa Nacional de control de la Tuberculosis – Normas técnicas". Ministerio de Salud, Argentina. 2013.
- 5- "Guía para el control de la tuberculosis en poblaciones privadas de la libertad de América Latina y el Caribe – Abordaje a poblaciones vulnerables". Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC. 2008.
- 6- "Extensive Mycobacterium tuberculosis circulation in a highly endemic prison and the need for urgent environmental interventions". *Epidemiology and infection*. Vol. 140, número 10. 2011.
- 7- "Tuberculosis in a South African prison – a transmission modelling analysis". *South Africa Medical Journal*. Vol 101, número 11. 2011.
- 8- "Prisons as reservoir for community transmission of tuberculosis, Brazil". *Emerging infectious diseases journal*. Vol. 21, número 3. 2015.
- 9- "Guidelines for control of tuberculosis in prisons". Tuberculosis Coalition for Technical Assistance, Interna-

- tional Committee of the Red Cross. 2009.
- 10- "Increased incidence of the outbreak strain of *Mycobacterium tuberculosis* in the surrounding community after an outbreak in a jail". Jones, Tf y otros. *Southern Medical Journal*. Vol. 96, número 2. 2003.
- 11- "Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*". Supply, P. y otros. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol, Nº 12. 2006.
- 12- "Persistence of a strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a prison system". Ijaz, K. y otros. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. Vol. 8, número 8. 2004
- 13- "Comparison between RFLP and MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Stockholm 2009 to 2011". *Plos One*. Volumen 9, número 4. 2014.
- 14- "Molecular, epidemiological and infectivity characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* strain prevalent in Madrid". Martín, A. y otros. *Clinical microbiology and infection, ESCMID*. Vol. 13, número 12. 2007.
- 15- "Spoligotyping User's Manual. A PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria". Gentaur Molecular Products. Bélgica. 2015.
- 16- SITVIT2. Laboratorio de investigación y de referencia sobre la tuberculosis y micobacterias. Instituto Pasteur de la Guadalupe. Isla Guadalupe, Francia.