

Micobacterias: nueva herramienta diagnóstica

12 min.



Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de diversas infecciones humanas con alta morbi -

mortalidad. Biomerieux presenta en este artículo un menú diverso de KITS que posibilitan desde la identificación de distintos tipos de Micobacterias como de genotipos resistentes a la Rifampicina - Isoniazida.



Dra. Roxana Zudiker
Microbiology Product Manager

bioMerieux Argentina



E-mail: roxana.zudiker@biomerieux.com



Introducción

Las micobacterias son un grupo de

Enfermedad Celíaca

Identificación de individuos susceptibles de enfermedad celíaca



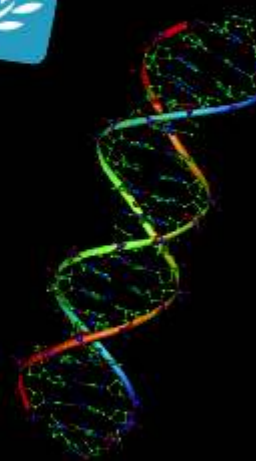
- PCR HLA DQ2 - DQ8 Screening

- PCR HLA DQ2 - DQ8 Typing:

HLA- DQA1*0201, DQA1*03, DQA1*05, DQB1*02, DQB1*0301/04, DQB1*0302, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*11, DRB1*12.



Molecular Diagnostic Essentials



Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "1" C1107APB - Buenos Aires - Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

microorganismos de gran importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de diversas infecciones humanas con alta morbi - mortalidad. Algunas enfermedades, como la tuberculosis y la lepra, han sido ligadas a la historia de la humanidad. A pesar de los esfuerzos realizados para su control, actualmente continúan siendo uno de los problemas sanitarios de mayor gravedad en el mundo, más aún en países en vía de desarrollo. La OMS estima que el mayor número de casos nuevos de tuberculosis en el año 2008 se ha producido en la Región de Asia Sudoriental, que representaron el 35% de los casos de la incidencia mundial.

Se estima que 1,7 millones de personas murieron de tuberculosis en 2009. El mayor número de muertes fue en el continente Africano. En 2008, se estima que la incidencia de tuberculosis por habitante era estable o decreciente en las seis regiones establecidas por la OMS. Sin embargo, el lento declive de las tasas de incidencia por habitante es compensado por el crecimiento demográfico.

En nuestro país, cada año, alrededor de 11.000 habitantes desarrollan la Tuberculosis y lamentablemente cerca de 800 personas mueren por esta causa en los hospitales, sanatorios y establecimientos de salud de nuestro territorio. Además, estos casos y muertes que se producen anualmente en nuestro país, no se dan de la misma manera ni en todo el territorio, ni en todos los grupos de población. La enfermedad produce proporcionalmente más casos en los hombres jóvenes que en las mujeres y la gente de mayor edad (13 hombres enfermos por cada 10 mujeres y 53% de los casos entre 15 y 44 años); y más casos y muertes en la población más desfavorecida social y económicamente que en los grupos de población con mejores condiciones de vida.

El laboratorio de Microbiología juega un rol muy importante en el control de la diseminación de la tuberculosis y otras micobacteriosis a través de la detección, aislamiento, identificación y test de susceptibilidad de dichos microorganismos. En los últimos años el aumento de la resistencia ha incrementado aún más la dificultad diagnóstica.

La elección de la metodología a

utilizar dependerá del tipo de pacientes y de los recursos disponibles a nivel hospitalarios, como de la organización en redes de laboratorios en el caso de referirnos al sector público de Salud.

En cuanto a los métodos de diagnóstico microbiológicos, si bien el cultivo sigue siendo el método Gold – estándar, los tiempos para la obtención de resultados son muy prolongados debiéndose esperar entre 6 a 8 semanas para descartar una muestra como negativa, con un tiempo promedio de positividad que ronda los 22 días solo para poder aislar la cepa y de allí recién se podrán realizar las pruebas de identificación y sensibilidad. Si bien en los años 90 se introdujeron en el país los sistemas automatizados acortando de sobremanera los tiempos diagnósticos, aún así estamos hablando de tiempos de positividad de 12 a 14 días para un cultivo positivo, a lo que hay que sumarle el tiempo de identificación y antibiograma que traerá aparejado mínimamente una semana más para la obtención del resultado final.

En la actualidad, la incorporación de los métodos de diagnóstico molecular acortan exponencialmente estos tiempos, reduciendo el T.A.T (turn around time) a resultados en el día, situación impensada en el pasado.

En este caso, la metodología presentada es la de DNA – STRIP (HAIN Lifescence - biomérieux) que permite la obtención de resultado en 4 a 5 hs, no solo de positividad a partir de una muestra clínica sino saber si la cepa causante de la patología es resistente o no a la combinación Rifampicina – Isoniazida (drogas marcadoras de resistencia al tratamiento de la tuberculosis).

¿Cuál es el principio y en qué consiste esta nueva metodología?

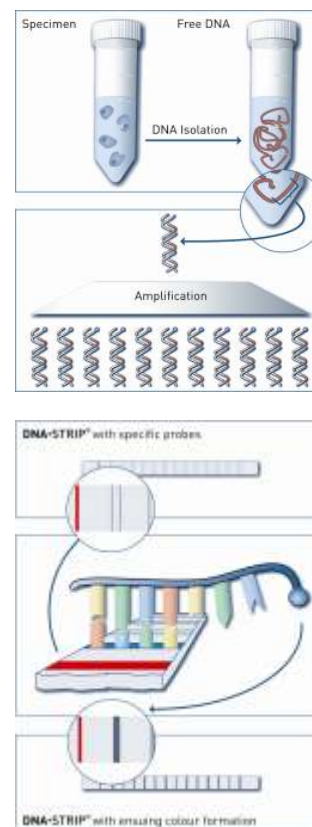
A partir de una muestra clínica o a partir de colonias en medio líquido o sólido (dependiendo el tipo de kit utilizado) se realiza la extracción del ADN o ARN como en cualquier técnica molecular, con posterior amplificación en forma selectiva, como se requiere para la reacción sucesiva ácido nucleico de cadena simple la desnaturalización es el paso sucesivo a la amplificación.

Los amplicones de simple cadena se van a unir a sondas específicas que se encuentran cubriendo las tiras de DNA – STRIP permitiendo hacer visible la hibridación mediante una coloración enzimática subsecuente.

Como resultado, aparece un patrón de bandas específico en la tira que se puede visualizar en forma macroscópica.

La evaluación de la tira se realiza de manera sencilla con ayuda de, una plantilla y de este modo se identificara en genotipo o identificará el microorganismo en cuestión.

En resumen, en solo tres pasos: extracción, amplificación, hibridación; se realiza la detección molecular. Por lo que esta metodología está al alcance de cualquier laboratorio que está realizando técnicas de Biología Molecular.



¿Qué es lo que permite resolver esta metodología, en el laboratorio de Microbiología?

Existe un menú diverso de KITS que posibilitan desde la identificación de distintos tipos de Micobacterias como de genotipos resistentes a la Rifampicina - Isoniazida. A continuación se detalla el menú correspondiente:

GenoType® Mycobacteria Direct:

Este kit permite identificar en forma directa a partir de una muestra clínica, basándose en la tecnología NASBA y DNA-STRIP® la detección simultánea de *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. maloenense* y complejo *M. tuberculosis*.

El procedimiento se divide en tres pasos: aislamiento del ARN mediante un método de captura con partículas magnéticas, amplificación basada en la técnica NASBA (Nucleid Acid Sequence Based Amplificación) e hibridización reversa. A su vez, la hibridización incluye los siguientes pasos: desnaturalización química del producto amplificado, hibridización de amplicones de simple cadena marcados con biotina a sondas unidas a la membrana,

lavado astringente y adición de un conjugado de fosfatasa alcalina/ Streptavidina.

A fin de validar el funcionamiento correcto del test y la funcionalidad de los reactivos cada tira incluye 2 zonas de control, un control interno de amplificación y control positivo. La especificidad es de un 99% y sensibilidad varía entre B.A.A.R + 97,5% y B.A.A.R - 83,3%.

GenoType® MTBC:

A partir de cultivo positivo de medio sólido o líquido el kit permite, en base a los polimorfismos genéticos entre otros el de la Girasa B, la diferenciación genética de cepas pertenecientes al grupo *Micobacterium tuberculosis complex*: *M. africanum*, *M. bovis BCG*, *M. bovis spp*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. tuberculosis*/ "*M. canetti*".

El procedimiento se divide en tres pasos, como en el resto de los Kits subsiguientes, aislamiento del DNA, amplificación múltiplex con primers

marcados con biotina e hibridización reversa. En relación a lo que respecta a la hibridización, esta incluye los mismos pasos especificados en el Kit mencionado precedentemente.

En este caso los controles son: control de conjugado y control universal. En cuanto a la sensibilidad y especificidad es del 100%.

GenoType® CM:

Con el crecimiento del número de pacientes inmunocomprometidos, ya sea por enfermedades que afectan en forma directa al sistema Inmune como el HIV o la aplicación de tratamientos quimioterápicos o inmunomoduladores en pacientes oncológicos o trasplantes respectivamente, la necesidad de identificar a micobacterias atípicas (M.O.O.T.), en general de origen ambiental, se ha ido incrementando. De allí que este kit resuelve un problema complejo dada la necesidad de realización de múltiples pruebas bioquímicas que solo se realizan en centros de referencia. Este test permite, a partir de cultivo en medio sólido

Iris[®]
Diagnostics Division

Sistema Automatizado de Urinalysis



BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

o medio líquido, la identificación de 13 especies de las micobacterias atípicas más comúnmente encontradas en clínica, a saber: *M. avium* spp, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. Scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. Tuberculosis* complejo, *M. xenopi*.

Esta prueba se utiliza cuando, después de utilizar el KIT anterior (GenoType® MTBC), solamente se desarrolla la banda específica de género *Mycobacterium*.

Los amplicones generados para la utilización del GenoType® MTBC pueden ser utilizados para hibridar, sin necesidad de una segunda PCR. Posee tres tipos de controles: un control de conjugado, un control universal y un control de género. Tiene una sensibilidad del 97% y la especificidad del 93,5%

GenoType®MTBDR plus:

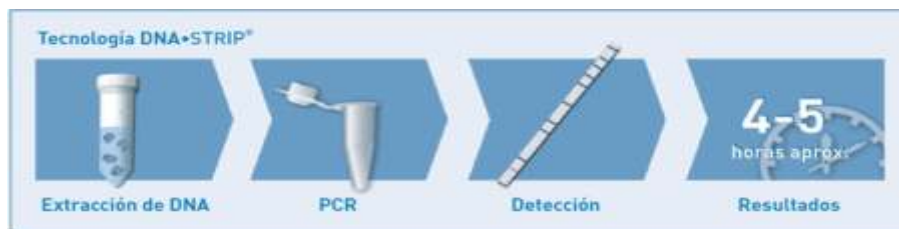
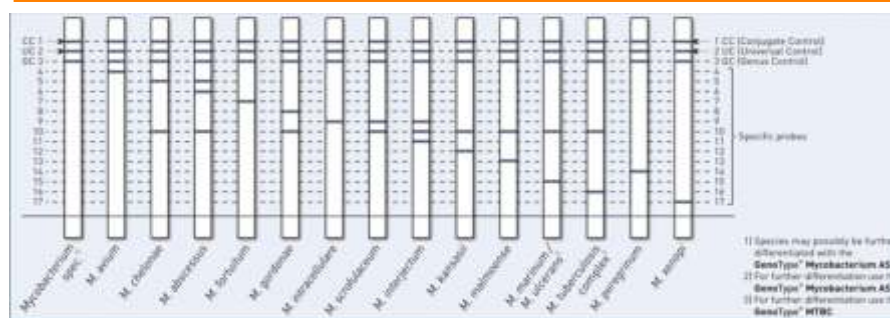
La tuberculosis MDR se define como la tuberculosis que es resistente a dos de las drogas más potentes en el tratamiento de la tuberculosis, la Rifampicina y la Isoniazida, la tuberculosis multiresistente es un reto para el control de la enfermedad debido a su complejo diagnóstico y dificultades aparejadas a su tratamiento.

En este caso, este test permite la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a Rifampicina y/o Isoniazida desde cultivos en medio sólido o líquido o a partir de muestra respiratorias con baciloscopia positiva.

La identificación de la resistencia a la Rifampicina es posible gracias a las mutaciones más significativas del Gen *rpoB*. Para la detección de la resistencia de alto nivel a la Isoniazida se testea el Gen *katG* y para la resistencia a Isoniazida de bajo nivel el gen *inhA*.

En este caso, el Kit incluye cinco zonas de control: un control de conjugado, un control de amplificación y tres zonas de control de locus de los genes *rpoB*, *katG* y *inhA*.

La sensibilidad y especificidad varía obviamente si se realiza a partir de la mues-



tra directa siendo:

- Sensibilidad a Rifampicina: 96,8%, Isoniazida: 90,2%
- Especificidad: Rifampicina: 95 %, Isoniazida: 100%

Desde cultivo en medio sólido o líquido:

- Sensibilidad a Rifampicina: 98,7 %, Isoniazida: 92%
- Especificidad: Rifampicina: 100 %, Isoniazida: 100%

Hay que tener en cuenta que en todas las metodologías, aún las más modernas como en los sistemas automatizados, existen numerosos inconvenientes

Como conclusión, esta metodología permite:

- La obtención de resultados rápidos: 4 – 5 hs.
- Posee alta sensibilidad y especificidad: entre 90% a 100%
- Tiene controles internos, documentan la validez de los resultados.
- Posee alta confiabilidad: dada por la amplificación e hibridación específica del target seleccionado.
- Posee certificación ISO 9001 – Marcado CE Permite desde el punto de vista epidemiológico la aplicación de un tratamiento temprano adecuado reduciendo la transmisión y diseminación de la TBC

multiresistente.

- Es una metodología simple y accesible en cualquier laboratorio de Biología Molecular.

Bibliografía

- <http://www.who.int/en/>
- http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/arg.pdf
- http://www.anlis.gov.ar/inst/INER/prog_tuber.html
- Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. *Eur Respir J.* 2008 Nov;32(5):1165-74. Epub 2008 Jul 9.
- Cristina Russo, Enrico Tortoli, and Donato Menichella. Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species. *Journal of Clinical Microbiology*, February 2006, p. 334-339, Vol. 44, No. 2
- F. Franco-Álvarez de Luna, P. Ruiz, J. Gutiérrez, and M. Casal. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct Assay for Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Four Atypical Mycobacterial Species in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, August 2006, p. 3025-3027, Vol. 44, No. 8
- Marinus Barnard, Heidi Albert, Gerrit Coetzee, Richard O'Brien and Marlein E. Bosman. Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 177, pp. 787
- H. Syre, 1,2* V. P. Myneedu, 3 V. K. Arora, 3 and H. M. S. Grewal. Direct Detection of Mycobacterial Species in Pulmonary Specimens by Two Rapid Amplification Tests, the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test and the GenoType Mycobacteria Direct Test. *Journal of Clinical Microbiology*, November 2009, p. 3635-3639, Vol. 47, No. 11
- A Lacoma, N Garcia-Sierra, C Prat, J Ruiz-Manzano, L Haba, S Rosés, J Maldonado, and J Domínguez. Assessment of the GenoType MTBDRplus for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis in strains and clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.00618-08

