

# Uso e interpretación de los métodos de detección rápida de la resistencia

Taller UITB 2011

Pere Coll Figa

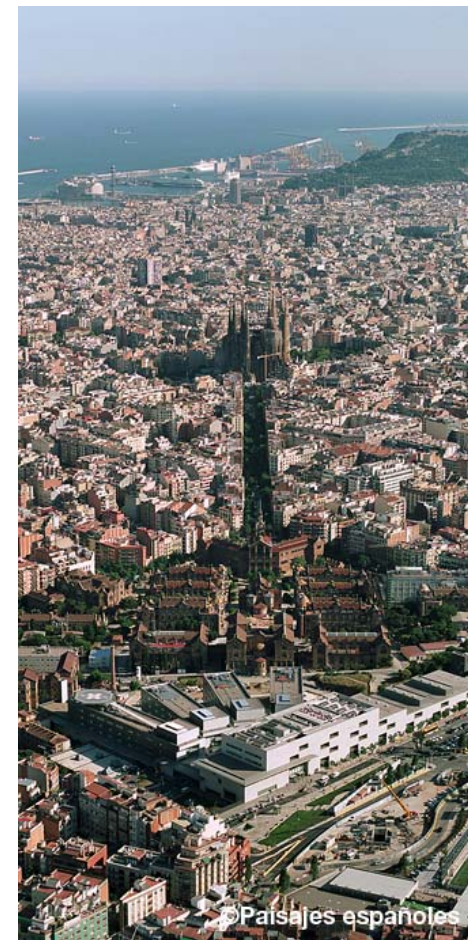
*28 de Noviembre de 2011*

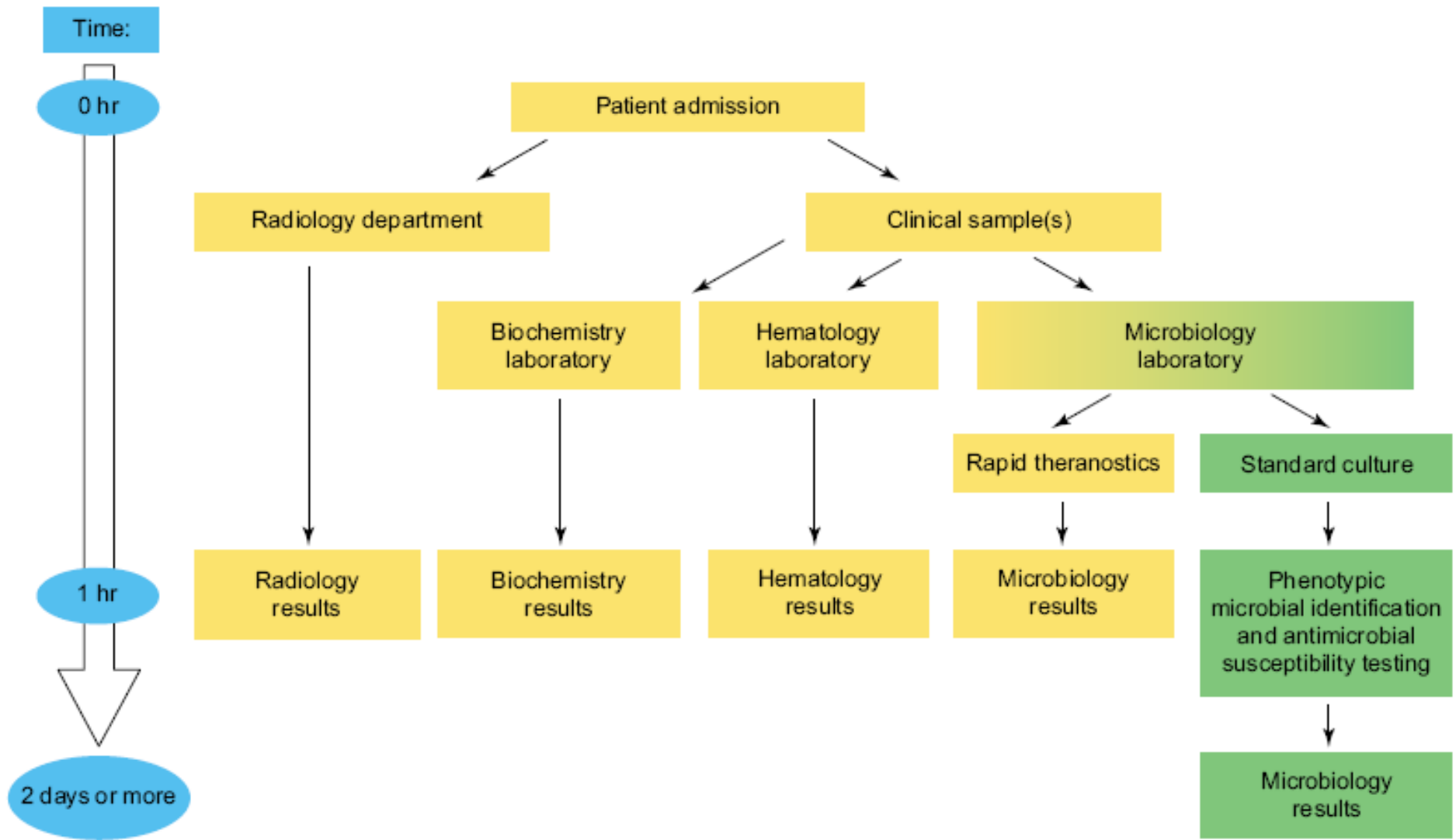
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau



# Relación de contenidos

1. Introducción
2. Características de las técnicas de diagnóstico rápido
3. Necesidades para las pruebas de diagnóstico rápido
4. Diagnóstico rápido de la tuberculosis
5. Indicaciones
6. Conclusiones





*Drug Discovery Today*

# Características

## 1. Realizarse 24 horas al día 7 días a la semana:

- Personal sin formación en Biología Molecular
- Formato analítico sencillo con mínima manipulación
- Presentación para una sola muestra

## 2. Proceso analítico rápido (hora y media):

- Influir en la toma de decisiones iniciales

## 3. Detección del microorganismos y de mecanismos de resistencia (theranostics)



# Necesidades

## 1. Conocimiento de la genómica (dianas a detectar):

- Conocimiento del genoma completo de muchos microorganismos.
- Variaciones genómicas infraespecíficas. Secuenciación del genoma completo de varias cepas
- Desarrollo de la bioinformática: Genómica comparativa, genómica funcional.
- Detección de dianas para la identificación pero también de mecanismos moleculares de resistencia.



# Necesidades (genómica tuberculosis)

## Detección de *M. tuberculosis*:

- Diana específica con marcos conservados para el diseño de los iniciadores.

## Detección de los mecanismos moleculares de resistencia (tbc)

- Resistencia fácil de detectar molecularmente:
  - > Rifampicina: región *core* del gen *rpoB*.
  - > Quinolonas: QRDR de los genes *gyrA* y *gyrB*
- Resistencia difícil de detectar molecularmente:
  - > Isoniazida. Codón 315 del gen *katG* + región reguladora *mabA-inhA* = 60% R
  - > Aminoglucósidos. Loop 530 y la región 912 del gen *rrs* y el gen *rpsL* = 67% R



# Necesidades

## 2. Sistemas de extracción de ácidos nucleicos rápidos, sencillos y eficientes:

- Extracción de ácidos nucleicos (DNA/RNA) de una gran variedad de microorganismos y por tanto capacidad de lisis de una gran variedad de paredes siendo la de las micobacterias de especial dificultad.
- Protección de los ácidos nucleicos extraídos de las nucleasas y eliminación de los inhibidores de la muestra.

**La extracción de los ácidos nucleicos es probablemente el paso más crítico de cualquier reacción de amplificación.**

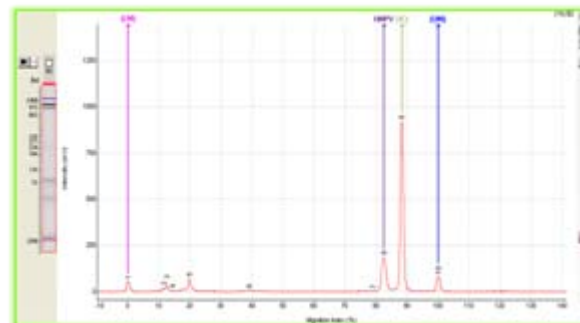
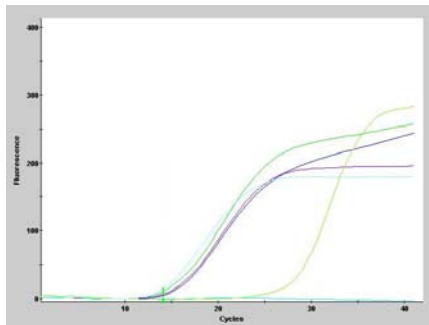
**Los extractores automatizados aseguran una mayor reproducibilidad de los resultados obtenidos.**



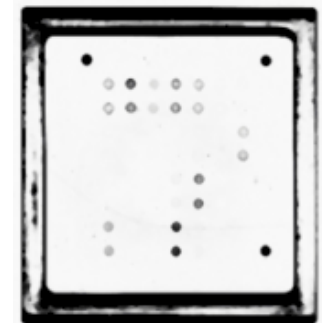
# Necesidades

## 3. Sistemas de amplificación de dianas universales o múltiples y de revelado que aseguren una sensibilidad analítica suficiente:

- Progreso en el diseño de PCR múltiples
- Revelado:
  - > Sondas marcadas con fluoro cromos (PCR a tiempo real)
  - > Electroforesis capilar con análisis del tamaño de los fragmentos amplificados
  - > Técnicas de hibridación sobre membrana o microarray



c.c.  
MTB  
S1  
S2  
S3  
S4  
S5  
R2  
R4a  
R4b  
R5



# Necesidades

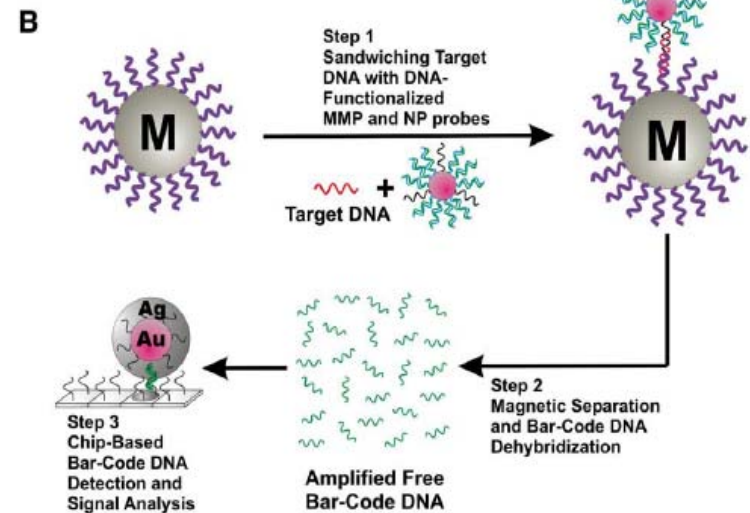
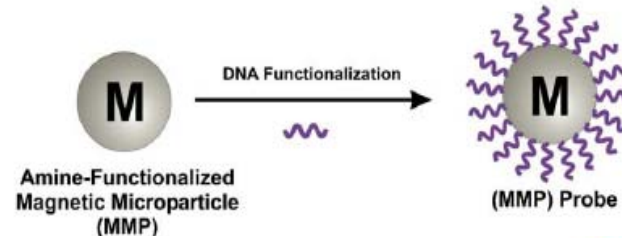
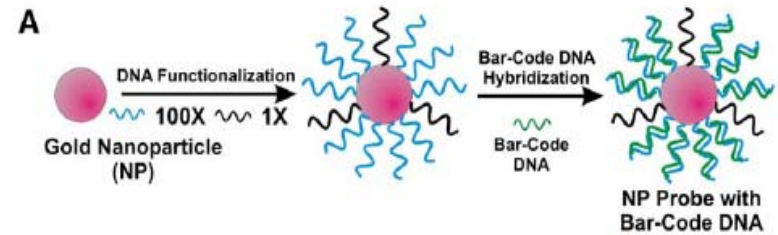
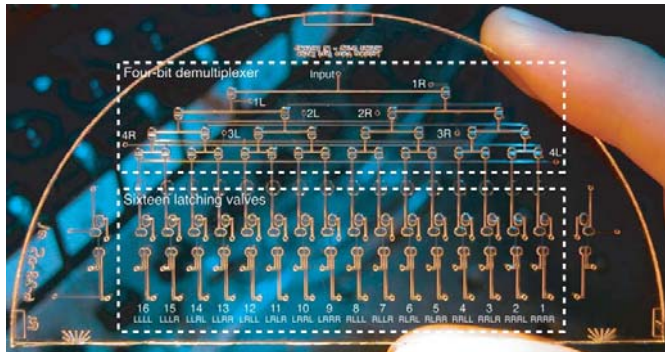
## Futuro:

### Nuevos biosensores:

- Ópticos, electromecánicos y piezoeléctrico
- No necesitan amplificación:
  - > Revelado en minutos.

### Formato en micro fluidos.

- Pequeña cantidad de reactivos



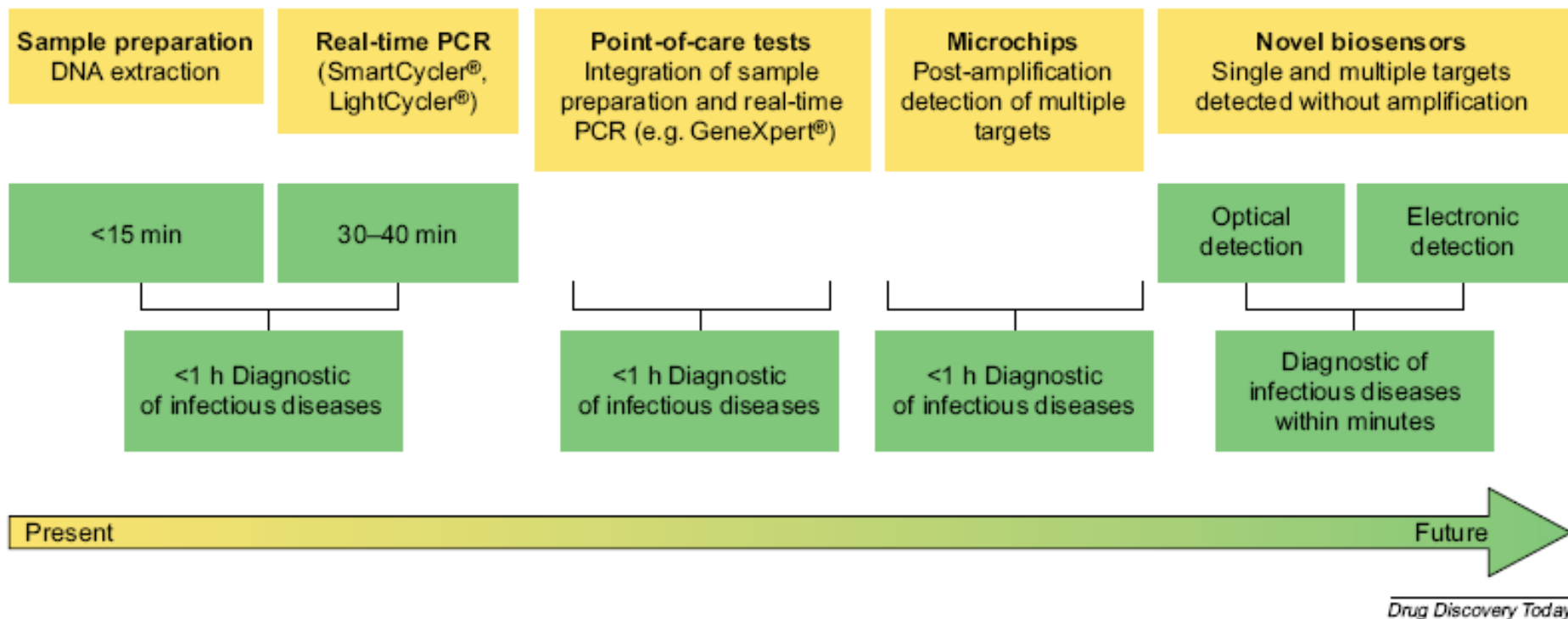
# Necesidades

## 4. Control de calidad del proceso

- Contaminación por amplicones
  - > Antiguamente zonas separadas (Pre y Post PCR)
  - > PCR a tiempo real: amplificación y revelado en sistema cerrado
  - > Actualmente se incluye así mismo la extracción
- Control de amplificación
  - > Antiguamente: controles positivos y negativos
  - > Actualmente:
    - control interno (amplificación simultánea de otra diana)
    - control automatizado de reactivos



# Presente y futuro de las técnicas de diagnóstico rápido



# Diagnóstico rápido en la tuberculosis

## Los métodos convencionales para el diagnóstico de la tuberculosis tienen importantes limitaciones:

- El examen microscópico es rápido y barato pero de sensibilidad limitada.
- El cultivo y el antibiograma son lentos, complejos y precisan de una infraestructura notable:
  - > No están disponibles en los países en vías de desarrollo
  - > Retraso diagnóstico:
    - Aumento de la morbimortalidad de la enfermedad y de su difusión
    - Impacto en la resistencia, multiresistencia y resistencia extendida
  - > Solo 30.000 de los 500.000 casos de multiresistencia son detectados y tratados adecuadamente.



# Diagnóstico rápido de la tuberculosis

## Necesidades:

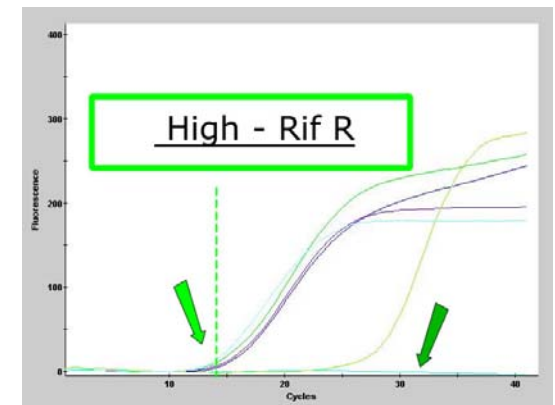
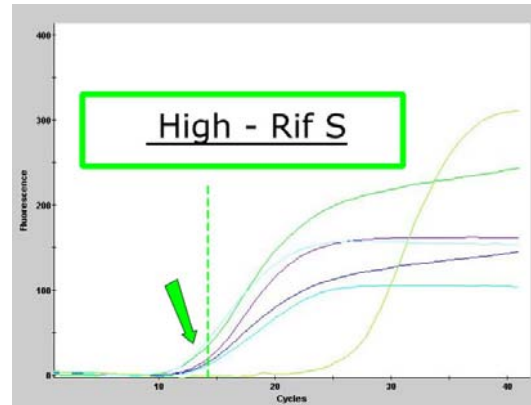
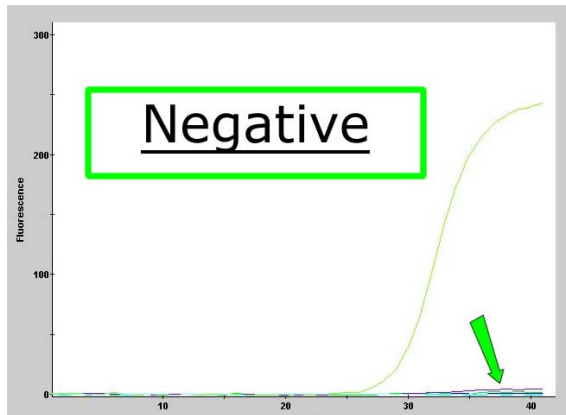
- Detectar directamente a *M. tuberculosis* en la muestra clínica diferenciando las cepas multiresistentes

## Características:

- Rápidos: resultados en 1h:30´
- Disponibles las 24h del día
- Sencillos: escasa manipulación (personal sin experiencia en BM)
- Sensibilidad, especificidad y reproducibilidad adecuadas.



# Diagnóstico rápido de la tuberculosis Xpert MTB/Rif (Cepheid)



- Heminested PCR a tiempo real
- Explora la región *core* del gen *rpoB* con cinco sondas marcadas con fluoro cromos.
- Detecta la presencia de *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina
- La resistencia a la rifampicina se utiliza como marcador de multiresistencia
- Dispone de un control interno basado en una amplificación adicional para detectar las inhibiciones

# Diagnóstico rápido de la tuberculosis Xpert MTB/Rif (Cepheid)

## Diagnóstico rápido de la tuberculosis:

- Sensibilidad:
  - > Muestras baciloscopia positiva: alrededor del 100%
  - > Muestras baciloscopia negativas: alrededor del 70%
  - > Dado que la baciloscopia suele ser positiva en alrededor del 70% de las muestras respiratorias, Xpert MTB/Rif detectaría el 91% de la tuberculosis pulmonar
- Especificidad:
  - > Elevada. Superior al 99%.



# Diagnóstico rápido de la tuberculosis Xpert MTB/Rif (Cepheid)

## Detección de la resistencia a la Rif: sensibilidad

- Límite de sensibilidad del 95%
  - > El 5% de la resistencia a la rifampicina fuera de la región *core* del gen *rpoB*. (Sea por mutaciones en este gen o por otros mecanismos: bombas de expulsión)
  - > Sensibilidad analítica de la región analizada cercana al 100%
- Falsa sensibilidad en poblaciones heteroresistentes (excepcional)
  - > El retraso en la hibridación de la sonda no es suficiente para considerar la cepa como resistente.



# Diagnóstico rápido de la tuberculosis Xpert MTB/Rif (Cepheid)

## Detección de la resistencia: especificidad

- Alta (95%) aunque algunas cepas detectadas como resistentes por Xpert MTB/Rif son fenotípicamente sensibles:
  - > Mutaciones silentes:
    - Xpert MTB/Rif detecta cualquier mutación
    - Degeneración del código genético. Mismo aminoácido distinto codón.
    - Polimorfismo en el codón 514 del gen *rpoB* (Alonso et al J Clin Microbiol 2011)
  - > En función de la mutación en *rpoB* la expresión de la resistencia puede ser de alto nivel (CMI elevada) o de bajo nivel (CMI cercana a la concentración crítica). En las cepas con resistencia de bajo nivel la reproducibilidad del antibiograma es escasa.
  - > La expresión de algunas mutaciones puede depender del *background* genético de la cepa (mecanismos reguladores o mecanismos compensadores).



# Indicaciones de los métodos de detección rápida de las resistencias

## General:

- En cualquier enfermo con sospecha clínica fundada de la enfermedad (centrada en el diagnóstico rápido de la enfermedad):
  - > Misma indicación que las pruebas de amplificación.
  - > La información adicional sobre la sensibilidad a la rifampicina no supone un incremento sustancial del coste y permite orientar el tratamiento inicial en los enfermos en los que no existe la sospecha de resistencia

## Restringida:

- En cualquier enfermo en el que se sospeche multiresistencia (centrada en el diagnóstico rápido de la multiresistencia)
  - > Pacientes procedentes de zonas con tasas elevadas de multiresistencia
  - > Pacientes con tratamientos anteriores

# Conclusiones

- **Las técnicas rápidas en microbiología deben poder detectar el microorganismo y mecanismos moleculares de resistencia para poder orientar el tratamiento empírico inicial.**
- **Deben ser rápidas, automatizadas, de manipulación muy limitada, de presentación unitaria y de utilización las 24 horas del día.**
- **Xpert MTB/Rif cumple estos criterios permitiendo diagnosticar alrededor del 91% de la tuberculosis respiratoria y con una sensibilidad analítica para la región *core* del gen *rpoB* cercana al 100%.**



# Conclusiones

- **Las poblaciones heteroresistentes, las mutaciones silentes, las mutaciones que se correlacionan con resistencias de bajo nivel o el *background genético* de determinadas cepas pueden dar lugar a discrepancias entre la caracterización molecular y el resultado del antibiograma. No obstante estos fenómenos son poco frecuentes.**
- **Las indicaciones de estas pruebas pueden estar centradas en el diagnóstico rápido de la enfermedad (cualquier enfermo con sospecha clínica fundada) o en el diagnóstico rápido de la multiresistencia (cualquier enfermo en el que se sospeche multiresistencia).**



Muchas gracias por su  
atención