

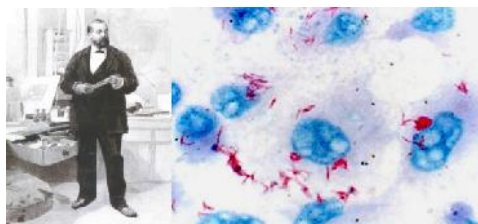
Pruebas de FS de primera y segunda línea. Pruebas moleculares

Departamento de Bacteriología
Laboratorio de Micobacterias
InDRE, DGE, SSA

Dr. en C. Armando Martínez Guarneros

09 de junio, 2015

Tuberculosis



1882. Roberto Koch
Mycobacterium tuberculosis



1890-91. La tuberculina como herramienta diagnóstica (un éxito) y como remedio (un fracaso)



1943. Estreptomicina (Waksman)



1951. Isoniacida

1972. Rifampicina



1993. La OMS declara la TB una emergencia global

2005. Secuenciación de nva generación



1998. Secuencia del Genoma de *M. tuberculosis*



2010
Xpert MTB/RIF



Actualmente

- 9 millones casos nuevos de TB
- 1.5 millones de muertes al año
- 13% coinfectados con HIV/MTB
- 480,000 Casos de TB-MR (9%XDR).
- 58% de los casos Dx (Xpert MTB/RIF)

1860 1880 1900 1920 1940 1960 1980 1990 2000 2005 2010 2015 2020



1900. 12% de todas las muertes son debidas a MTB.

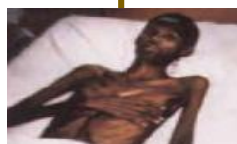
La mayoría de los adultos en Ciudades Europeas están infectados



1921. Vacuna atenuada de BCG



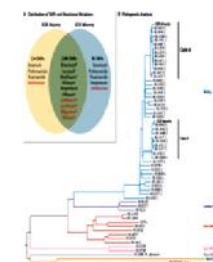
1990
TBMDR



2006-2009
TB-XDR



2010-2015
"NGS for *M. tuberculosis* DST"



Situación de la TBMFR a fármacos anti-TB

Se considera que la tercera parte de la población mundial esta infectada con TB; se estima que 9 millones de personas desarrollaron TB y 1.5 murieron.

TBMFR es la resistencia simultanea de una población micobacteriana a INH y RIF

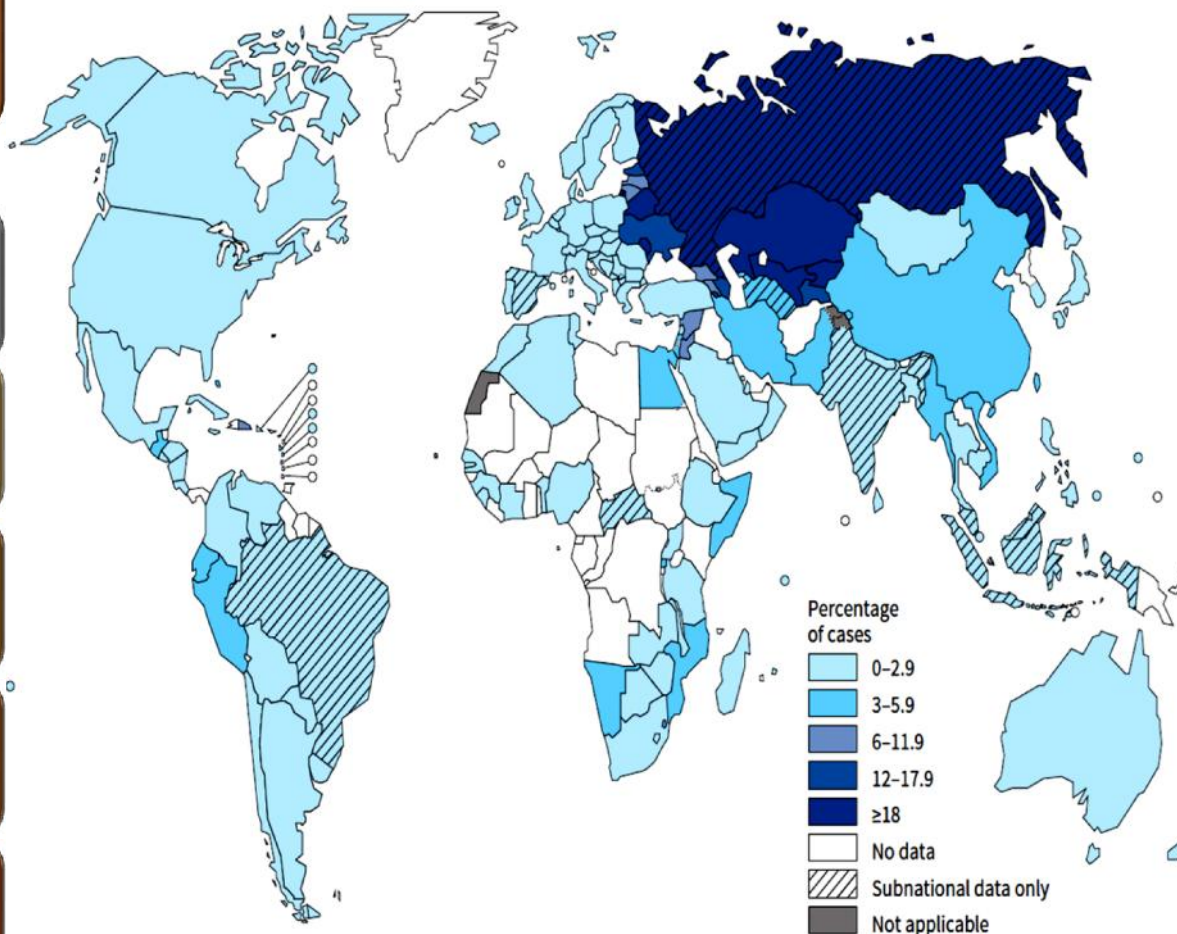
TBMFR esta presente en casi todo el mundo pero es más grave en Europa Oriental, China, Asia Central y algunos países de Latinoamérica

La situación es aún desconocida en muchos países del mundo

Se estiman 480,000 casos de TBMFR anualmente (9% XDR)

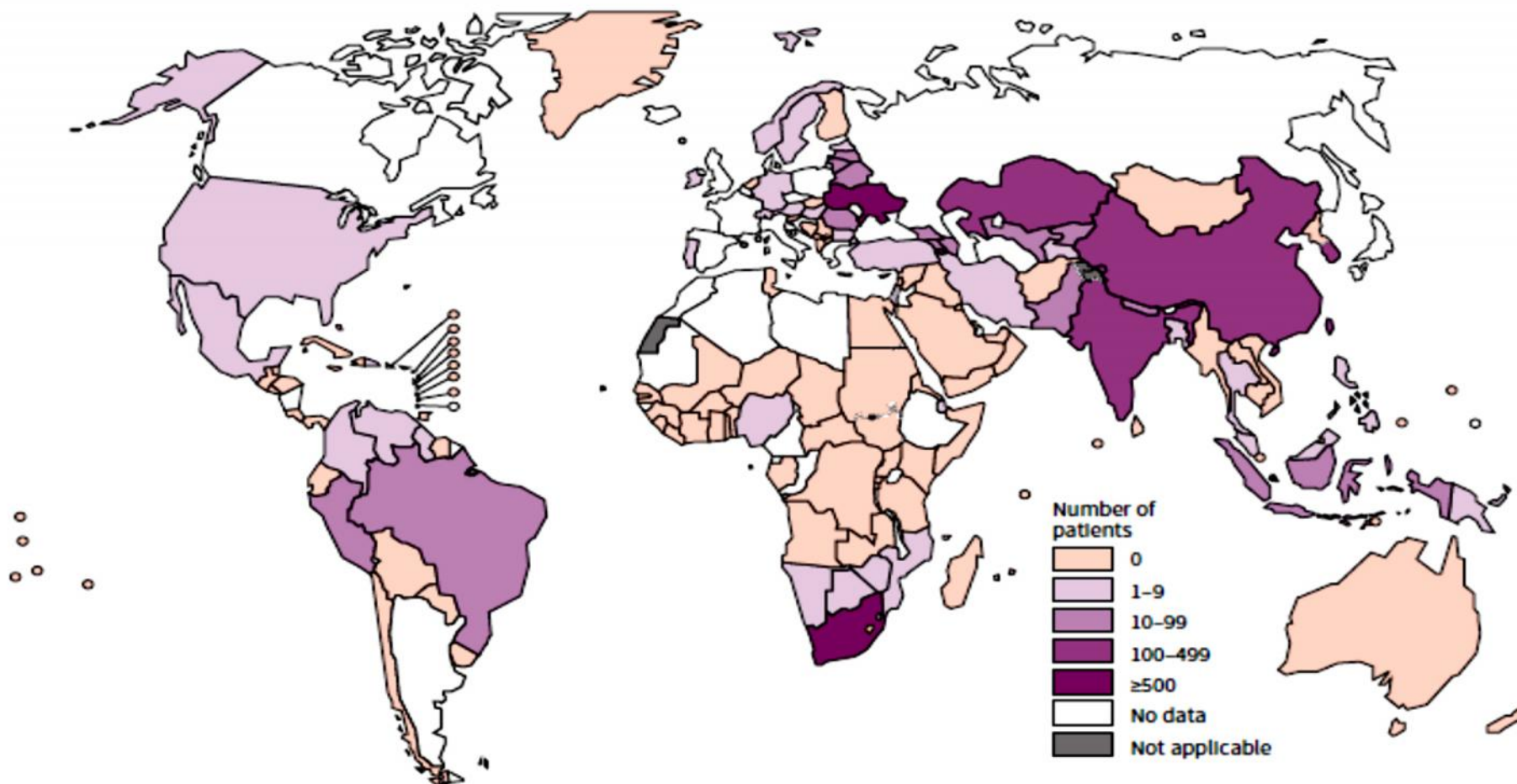
Las tasas más altas corresponden a la India, Rusia y China

Porcentaje de nuevos casos de TBMDR

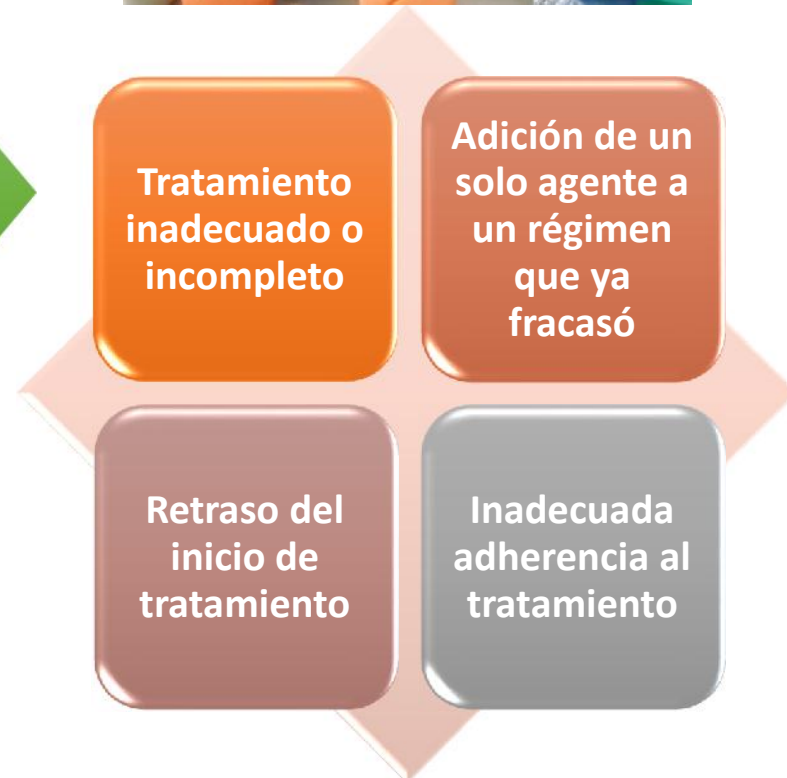
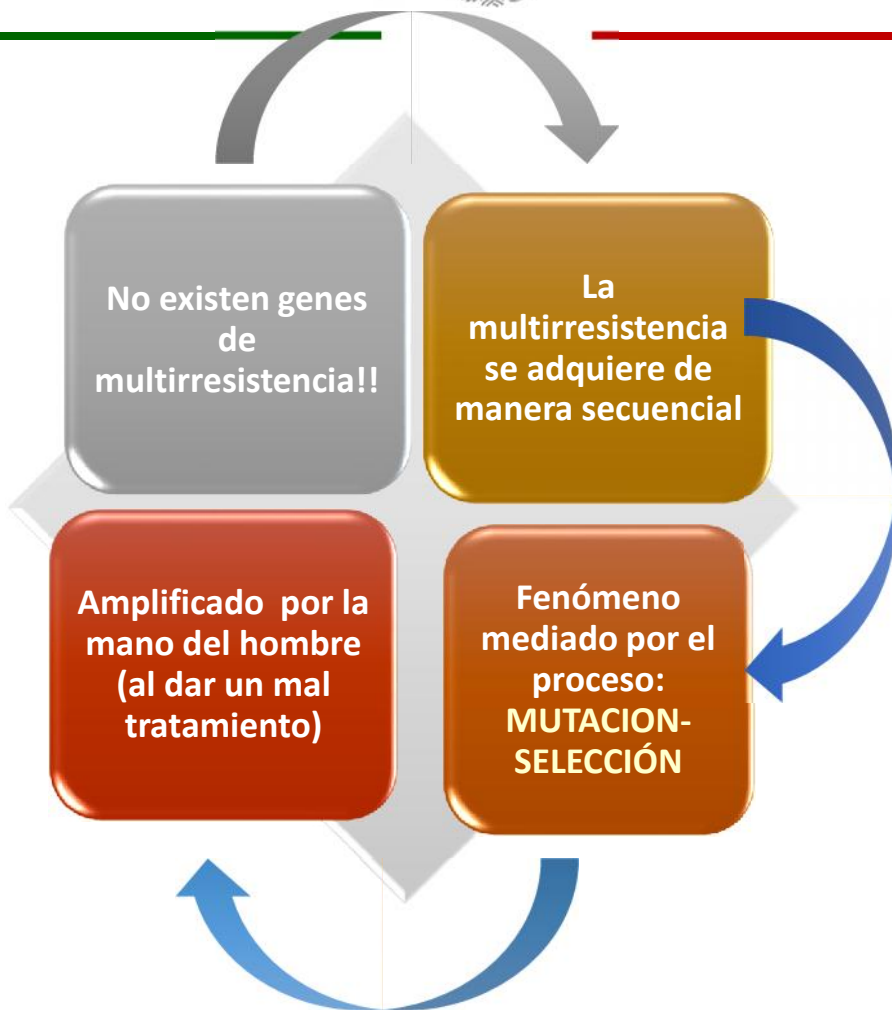


Países que reportan casos de TB-XDR

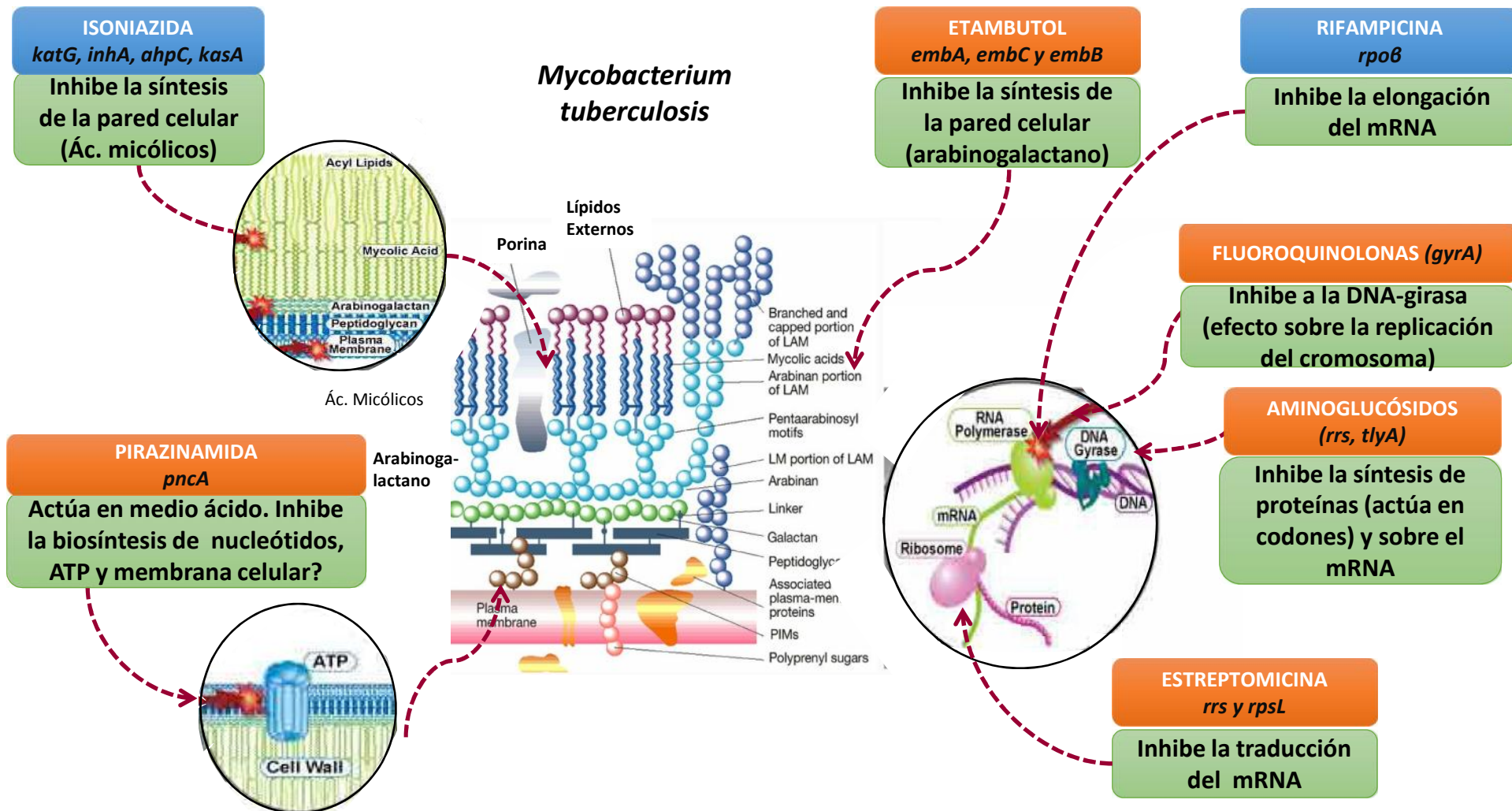
Number of patients with laboratory-confirmed XDR-TB started on treatment in 2013



Resistencia en tuberculosis



Dianas de los Fármacos anti-TB de primera y segunda línea



Técnicas bacteriológicas para determinar sensibilidad a fármacos 1ra y 2da línea

Pruebas fenotípicas	Pruebas genotípicas
Proporciones "Gold standard": LJ, 7H10, 7H11	InnoLiPA Rif TB [®]
MGTI 960 BD [®]	GenoType MTBDRplus [®] , MTBDRsl [®]
Nitrato Reductasa (NRA)	GeneXpert[®]
Capa delgada (TL-7H11)	Secuenciación de genes de resistencia
MODS	Otros:
Métodos colorimétricos tipo Redox	Secuenciación del genoma completo (WGS)

Estándares de laboratorio

Requisitos para la implementación



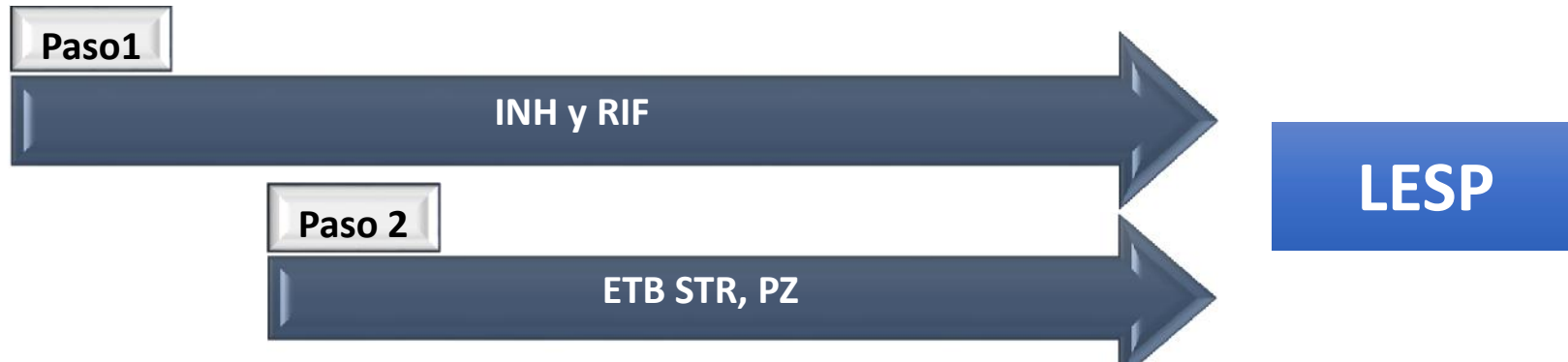
Infraestructura:

- **Contención**
- **Aseguramiento de la calidad**
- **Capacidad para adquirir experiencia**

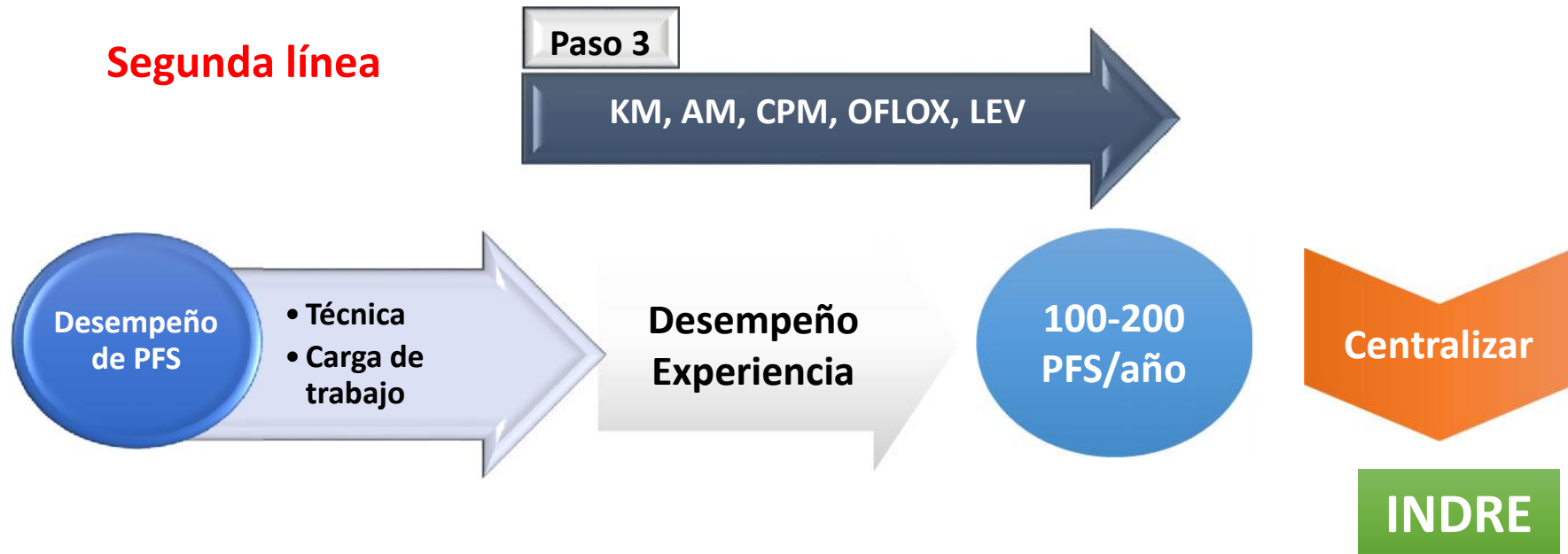


Enfoque sistemático de implementación de PFS

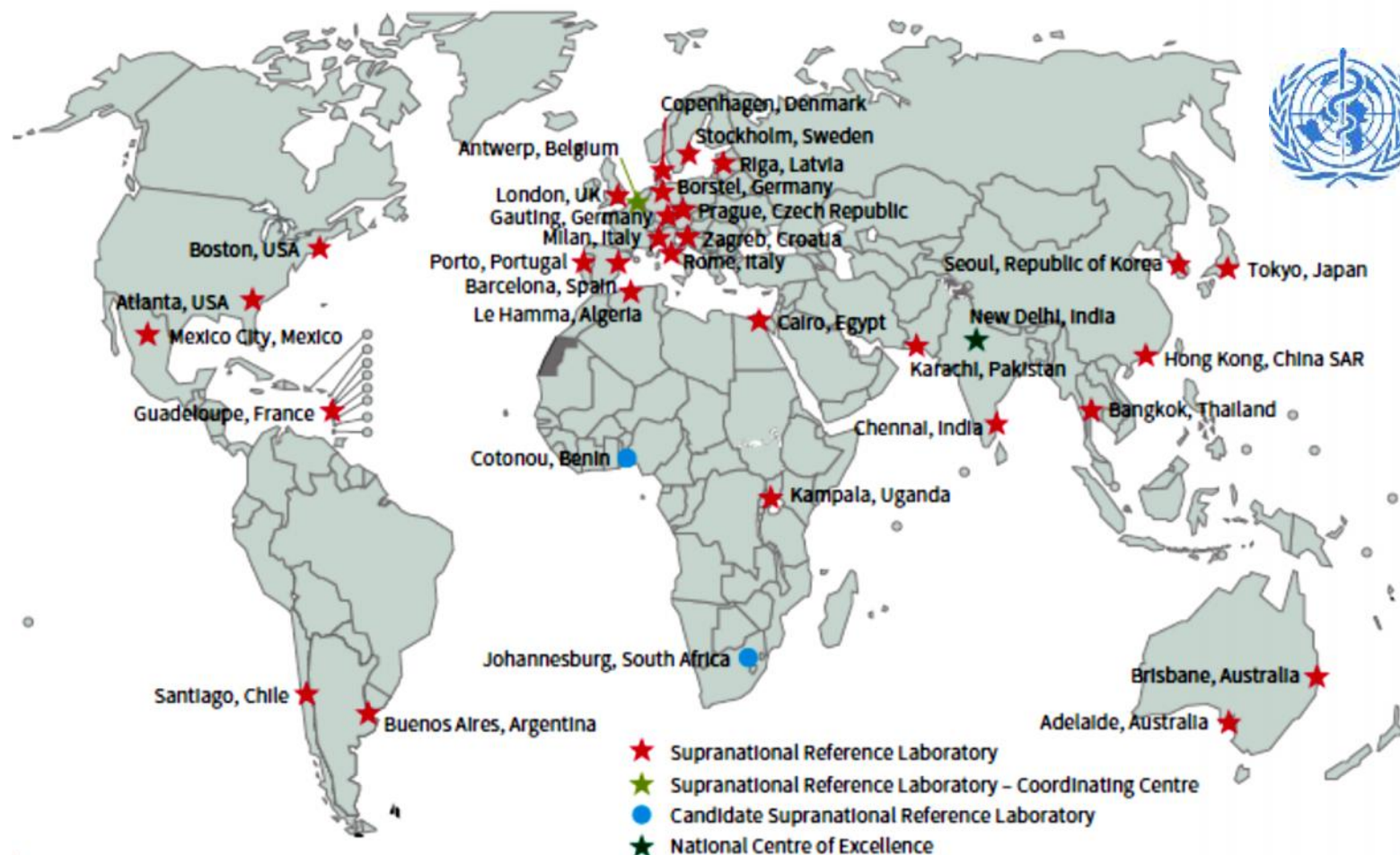
Primera línea



Segunda línea



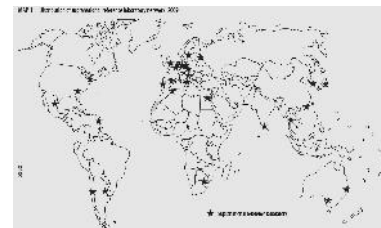
TB SUPRANATIONAL REFERENCE LABORATORY NETWORK (SRLN 34)



El CC del Dx por laboratorio en la TBMDR Y TBXDR es crucial; se debe asegurar la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de las PFS

La **SRLN** asegura los estándares de las **PFS** por un sistema de aseguramiento externo de la calidad que consiste:

- Una visita inicial al laboratorio
 - Pruebas de desempeño
 - Revisión periódica de aislados
- Las **PFS** deberán realizarse en un número limitado de laboratorios equipados, con experiencia; los cuales participen en un sistema de control de calidad.
- Como mínimo los laboratorios que realizan **PFS**, deben identificar correctamente la resistencia a **INH** y **RIF** sobre un **90%** en dos de tres paneles de control de calidad de la **OMS**.



Técnicas bacteriológicas convencionales de sensibilidad a fármacos 1ra y 2da línea

Método de las Proporciones en LJ y sus variantes Medios semi-sintéticos

Middlebrook 7H10 y 7H11

Resultados : 4-6 semanas

MGIT 960: fármacos de 1 y 2da línea

Resultados: 8-15 días



Medio líquido vs medio sólido

Ventajas:

- Mas rápido
- Alta calidad del medio
- Sistema totalmente automatizado
- PDS de 1^{ra}, 2^{da}, y nuevas drogas
- Bioseguridad: Tubos de plástico

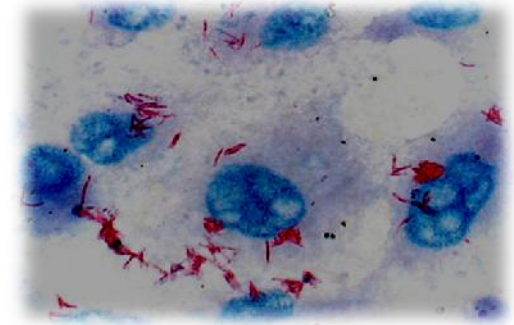
Desventajas:

- Costo
- Alto índice de contaminación
- Dependencia a una compañía



Pruebas rápidas fenotípicas no convencionales

- Sencillas y económicas
- Son pruebas que detectan la resistencia a INH y RIF en tiempos cortos (7-21 días)
- Se hacen en forma directa, es decir, a partir del esputo, sin necesidad de esperar el resultado del cultivo.
- Facilitan oportunamente la elección de **un mejor esquema de tratamiento** al diagnosticar o descartar la **TB MDR** en forma anticipada



Griess: NITRATO REDUCTASA

La nitrato reductasa es una enzima presente en *M. tuberculosis*. Es la encargada de reducir el nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2)

La nitrato reductasa es una alternativa para la realización de PFS a partir de muestras y aislamientos clínicos. La detección de nitrito se emplea como indicador de **viabilidad celular**, luego de la exposición de *M. tuberculosis* a los fármacos anti-tuberculosos.

Detección sensible de una pequeña cantidad de bioproducto metabólico, mejora el tiempo de respuesta

Ventajas

- Alta precisión, igual a la del método de referencia, para investigar la actividad de INH y RIF.
- Produce resultados en 10 días a partir de un cultivo positivo, y en 14 días a partir de una muestra de esputo con Bk +.

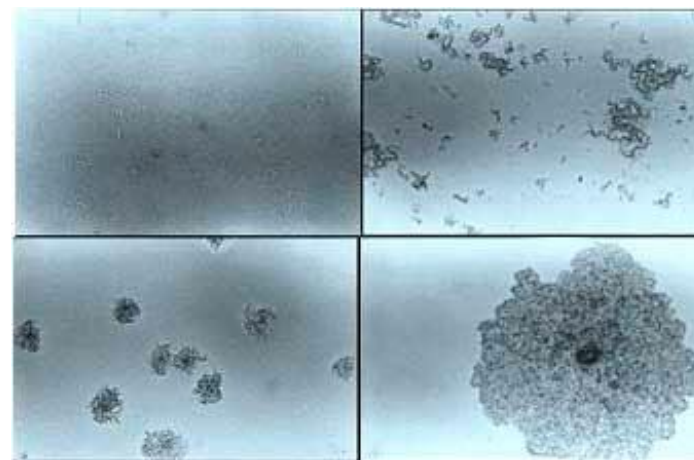
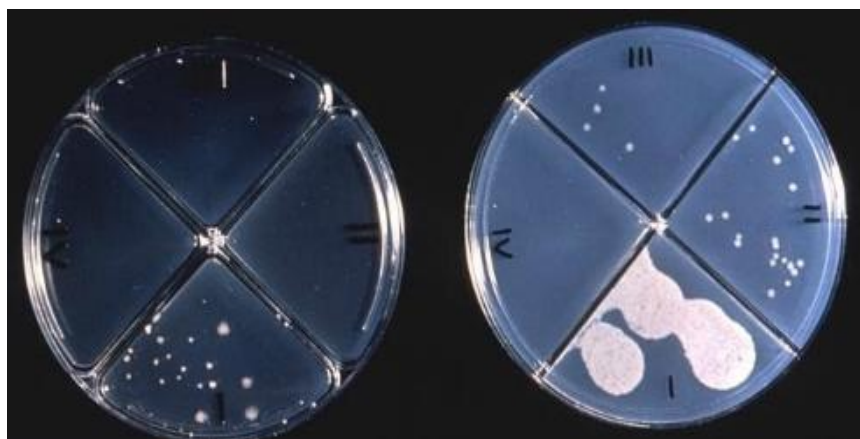
PRUEBA DE NITRATO-REDUCTASA (MNR)



Tubo control de crecimiento (día 10) Cepa sensible a R Cepa resistente a H

Capa delgada (TL7H11)

- Morfología de micro colonias en agar 7H11: identificación de TB por su morfología colonial
- Rápido, Barato
- Detecta mas del 60% de muestras positivas en los primeros 10 días y mas del 80 % después de 2 semanas comparado con el 10 % en medio LJ.
- **No comercial, Requiere entrenamiento importante y equipo**



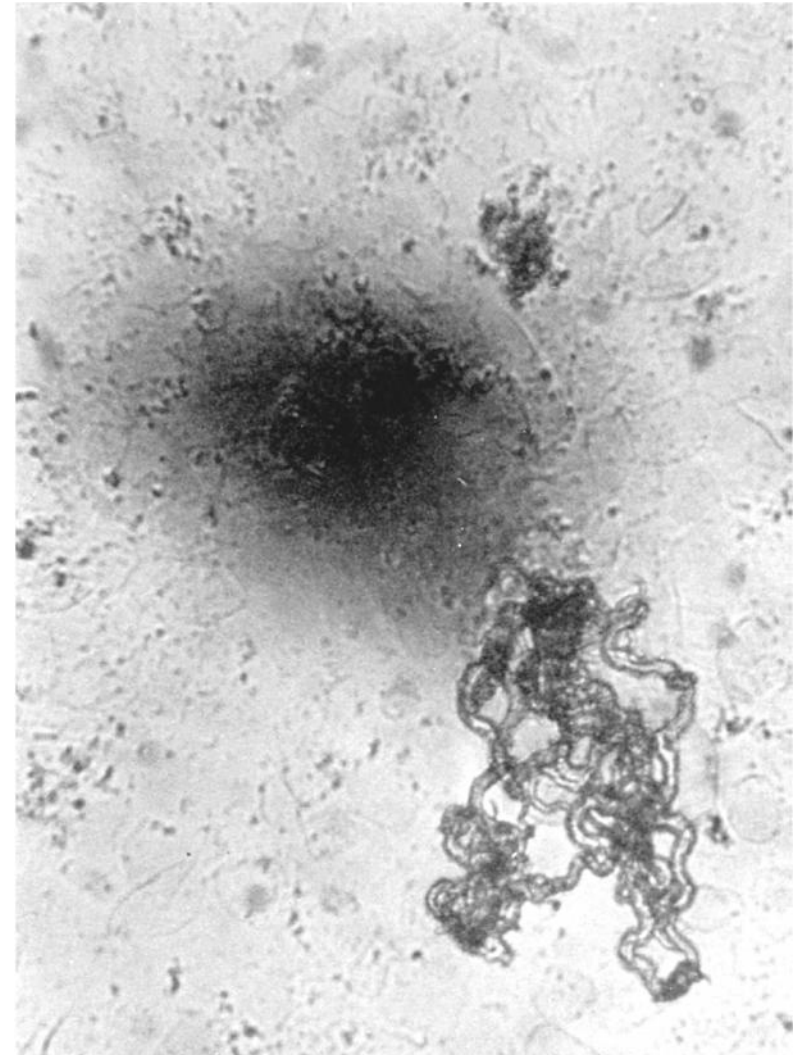
Microscopía de luz invertida (MODS)

Microcultivo en medio líquido (Middlebrook 7H9) en placa.
Determina el crecimiento micobacteriano temprano en los pozos de la placa.

Sensibilidad del MODS > al medio LJ (alrededor del 50%), < que el MGIT 960

Que se observa: El aspecto de cuerda cuando los bacilos proliferan (característico de MTB).

Los complejos *M. avium-intracellulare* y *M. kansasii* son diferenciados de MTB, ya que no adquieren en su crecimiento el aspecto de cuerda.



M. tuberculosis. Aumento 100x

MODS

- **MODS** se usa para el diagnóstico de TB y de TB-MDR (sensibilidad a INH y RIF) en muestras de esputo con Bk positiva o negativa.
- **Resultados** entre 7 y 21 días
- Comercial, Requiere entrenamiento importante y equipo



PERMITE UN DIAGNÓSTICO DE TBMDR EN MENOR TIEMPO

Métodos colorimétricos

Alamar azul (MABA). Primero en usarse para determinar FR en *Mtb*.

El reactivo es azul en su forma oxidada y cambia a rosa cuando se reduce.

MTT. (sales 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difenil tetrazolio).

Compuesto amarillo, que al reducirse metabólicamente por las micobacterias produce cristales insolubles de formazán de color púrpura.

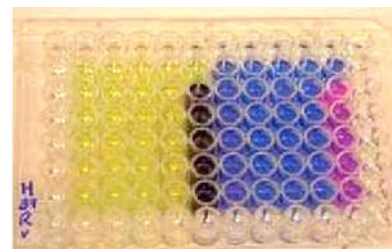
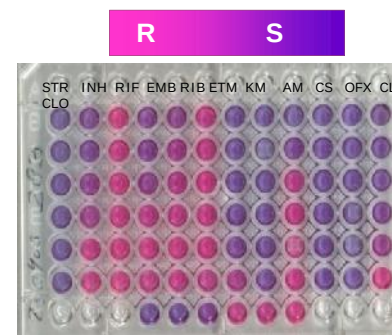
Resazurina (REMA). Componente principal del alamar azul.

Ventajas

- Buena reproducibilidad para INH y RIF
- Sensibilidad y especificidad del 98 %
- Resultados en 10 días.
- Lectura es directa
- Diferentes concentraciones de fármaco
- PDS de 1^{ra}, 2^{da}, y nuevas drogas.

Desventajas

- Infraestructura
- Personal entrenado
- Bioseguridad



Diagnóstico molecular

WHO Global plan (2006-2015): Desarrollo y uso de nuevas tecnologías para adoptar en países con recursos limitados

LiPA's= Line Probe Assay



GenoType MTBDR*plus*, InnoLiPA Rif.TB

- Hibridación inversa, colorimétrica
- Resultados en 6-7 h
- Flexibilidad (# pbas/tira: 30-40)
- Habilidad Técnica: Necesaria

Xpert MTB/RIF

- PCRtr Integrado/automatizado
- Resultados en 2h
- Sistema cerrado (limitada # pbas)
- Habilidad Técnica: Ninguna

Genes asociados a resistencia

Los métodos genotípicos para PFS se basan en la detección de mutaciones en genes asociados a resistencia de un microorganismo

Table 2 Main gene targets conferring resistance to first-line and some important second-line antitubercular agents in *Mycobacterium tuberculosis*.

Anti-TB drug ^a	Gene target	Encoded product	Main target region	Relative frequency in resistant strains (%)
RIF	<i>rpoB</i>	β -Subunit of RNA polymerase	81 bp RRDR ^b	90–95
RIF	<i>rpoB</i>	β -Subunit of RNA polymerase	N-terminal region	2–5
INH	<i>katG</i>	Catalase/oxidase	Entire gene	50–95
INH	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP reductase	Regulatory region	5–43
PZA	<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	Many codons	68–95
EMB	<i>embB</i>	Arabinosyl transferase	Many codons	35–89
SM	<i>rpsL</i>	Ribosomal S12 Protein	Few codons	20–81
SM	<i>rrs</i>	16S rRNA	Few nucleotides	10–30
FQs	<i>gyrA</i>	DNA gyrase, A subunit	Few codons	58–90
FQs	<i>gyrB</i>	DNA gyrase, B subunit	Few codons	2–8
KAN/AMI	<i>rrs</i>	16S rRNA	3'-end of 16S rRNA	80–85
KAN	<i>eis</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	Regulatory region	20–25
CAP	<i>rrs</i>	16S rRNA	3'-end of 16S rRNA	80–85
CAP	<i>tlyA</i>	Cytotoxin/haemolysin homologue	Several codons	6–10

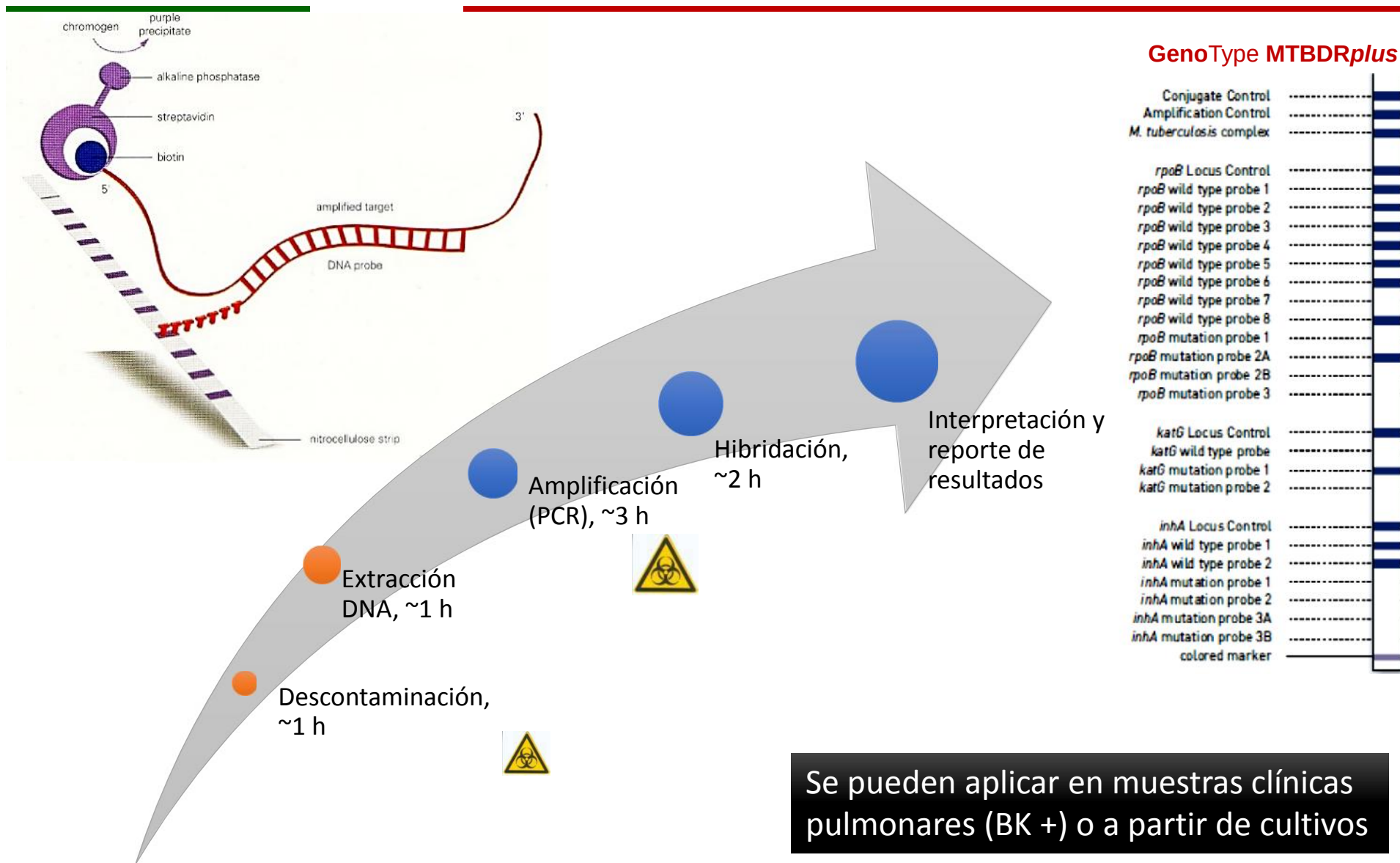
^a RIF, rifampicin; INH, isoniazid; PZA, pyrazinamide; EMB, ethambutol; FQs, fluoroquinolones (ofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin); KAN, kanamycin; AMI, amikacin; CAP, capreomycin.

^b RRDR, rifampicin resistance determining region.

Primera línea

Segunda línea

Sistema Genotype (LiPA's)

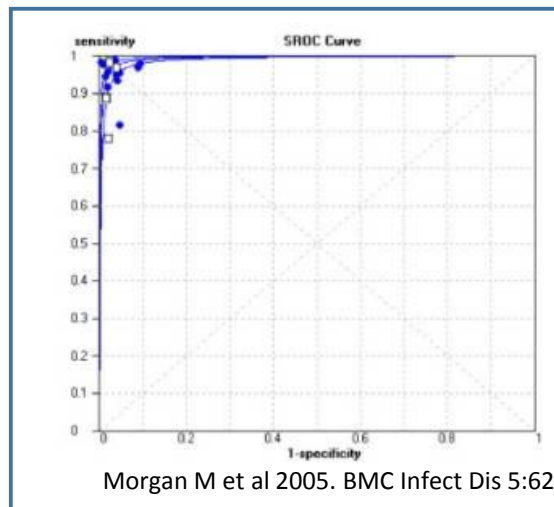


Se pueden aplicar en muestras clínicas pulmonares (BK +) o a partir de cultivos

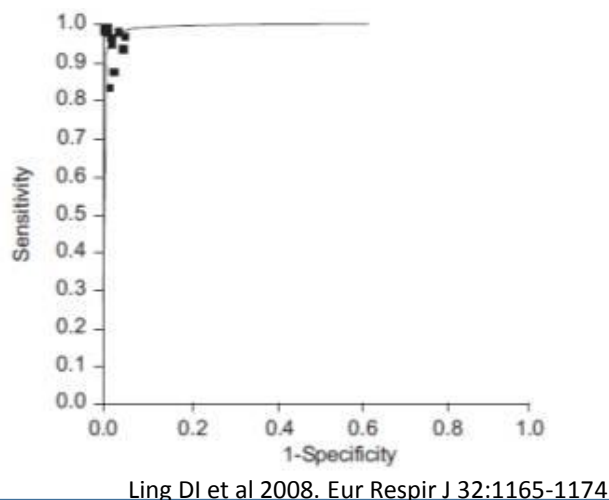
Desempeño de las LPA's

Rifampicina

Inno-LiPA Rif.TB

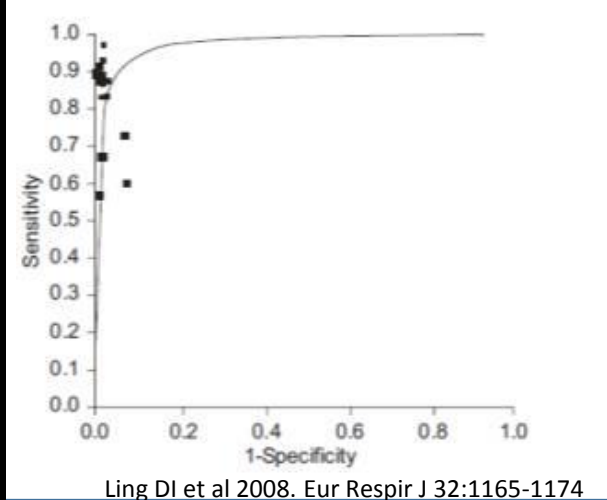


GenoType MTBDRplus

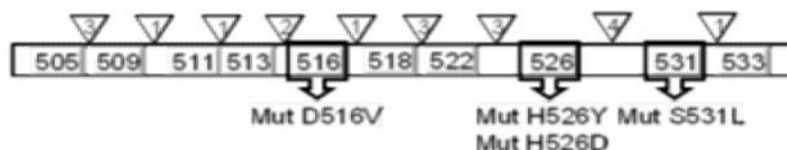


Isoniazida

GenoType MTBDRplus



Gen Hot-spot *rpoB*



Sensibilidad 95-98%
Especificidad 98-100%

Sensibilidad 95-99%
Especificidad 97-100%

Muestras clínicas

Sensibilidad 95-99%
Especificidad 97-99%



cod. 315 gene *katG* nt -8,-15,-16 gene *inhA*

Sensibilidad 82-93%
Especificidad 95-100%

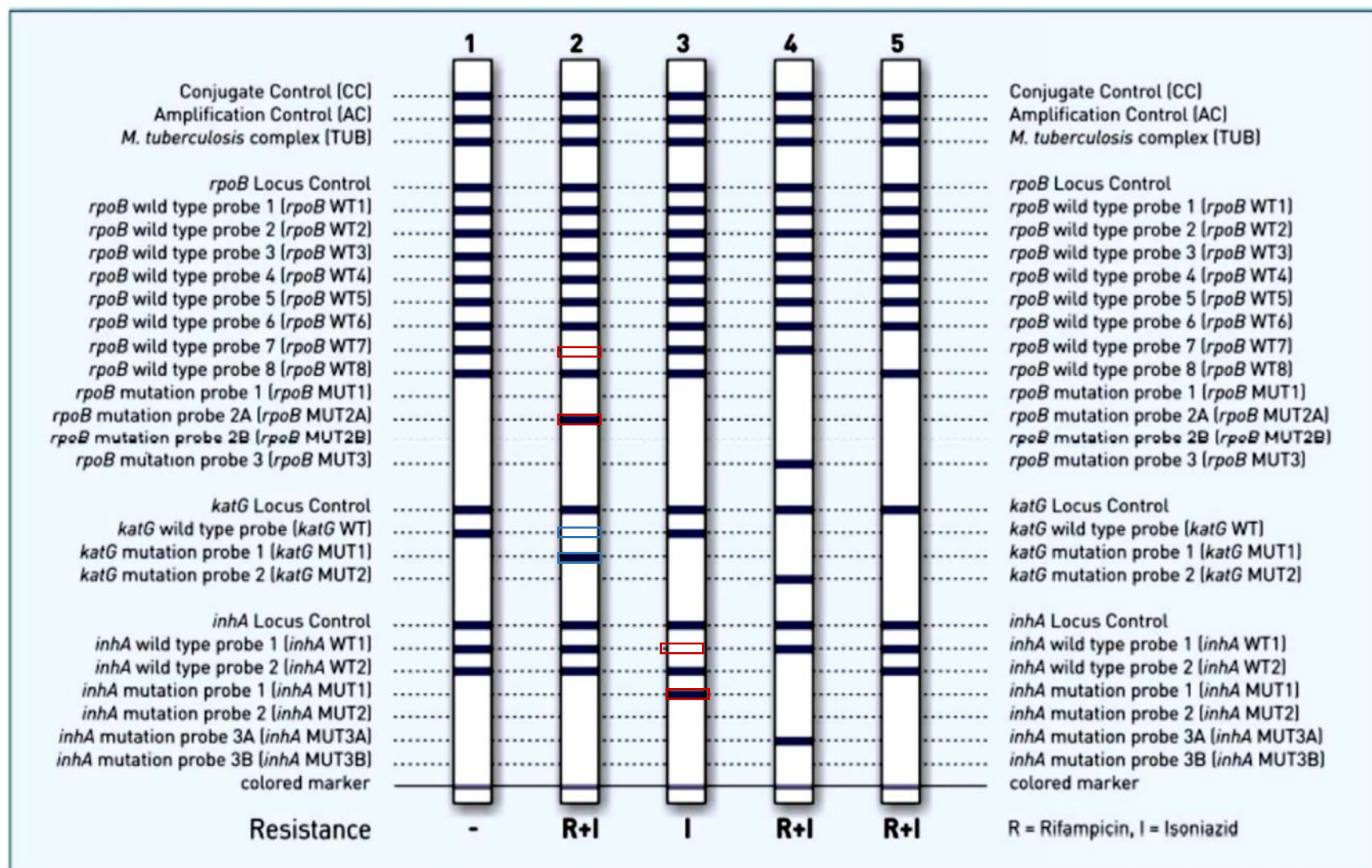
Muestras clínicas

Sensibilidad 72-92%
Especificidad 96-99%

El GenoType MDTBDR tiene excelente exactitud para identificar resistencia a RIF (aislados y muestras clínicas). No obstante la especificidad es excelente para INH, pero la sensibilidad encontrada fue variable y modesta

GenoType MTBDRplus

Interpretación de resultados



Recomendaciones WHO

MOLECULAR LINE PROBE ASSAYS FOR RAPID SCREENING OF
PATIENTS AT RISK OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS
(MDR-TB)



World Health
Organization

POLICY STATEMENT

27 June 2008

- Pueden realizarse a partir de un aislamiento o muestra pulmonar BK (+)
- Se recomienda el uso de pruebas comerciales
- Es una prueba cara (inversión inicial alta) y necesita un laboratorio con infraestructura y personal entrenado para su implementación
- No reemplaza al cultivo convencional ni a las PFS
- El cultivo se necesita para las muestras BK (-) y las PFS de segunda línea
- El tiempo de emisión de resultado es de 6 a hrs a 2 días

Genes asociados a resistencia

Table 2 Main gene targets conferring resistance to first-line and some important second-line antitubercular agents in *Mycobacterium tuberculosis*.

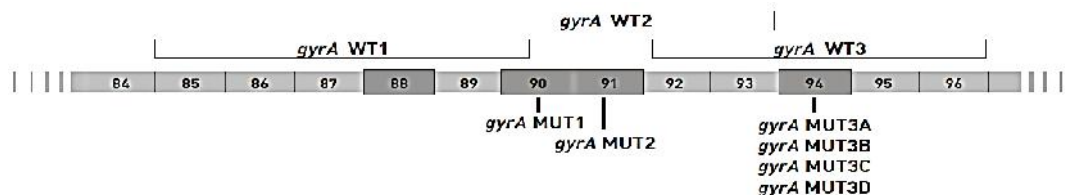
Anti-TB drug ^a	Gene target	Encoded product	Main target region	Relative frequency in resistant strains (%)
RIF	<i>rpoB</i>	β-Subunit of RNA polymerase	81 bp RRDR ^b	90–95
RIF	<i>rpoB</i>	β-Subunit of RNA polymerase	N-terminal region	2–5
INH	<i>katG</i>	Catalase/oxidase	Entire gene	50–95
INH	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP reductase	Regulatory region	5–43
PZA	<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	Many codons	68–95
EMB	<i>embB</i>	Arabinosyl transferase	Many codons	35–89
SM	<i>rpsL</i>	Ribosomal S12 Protein	Few codons	20–81
SM	<i>rrs</i>	16S rRNA	Few nucleotides	10–30
FQs	<i>gyrA</i>	DNA gyrase, A subunit	Few codons	58–90
FQs	<i>gyrB</i>	DNA gyrase, B subunit	Few codons	2–8
KAN/AMI	<i>rrs</i>	16S rRNA	3'-end of 16S rRNA	80–85
KAN	<i>eis</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	Regulatory region	20–25
CAP	<i>rrs</i>	16S rRNA	3'-end of 16S rRNA	80–85
CAP	<i>tlyA</i>	Cytotoxin/haemolysin homologue	Several codons	6–10

^a RIF, rifampicin; INH, isoniazid; PZA, pyrazinamide; EMB, ethambutol; FQs, fluoroquinolones (ofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin); KAN, kanamycin; AMI, amikacin; CAP, capreomycin.

^b RRDR, rifampicin resistance determining region.

Segunda línea

GenoType MTBDRsl



failing wild type probe(s)	codons analyzed	mutation probe	mutation	phenotypic resistance ¹
<i>gyrA</i> WT1	85-90		C88S	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT1	85-90		A88T	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94Y	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H ²	FLQ ^R

¹ FLQ: fluoroquinolones (e.g. ofloxacin and moxifloxacin); ^R = resistance

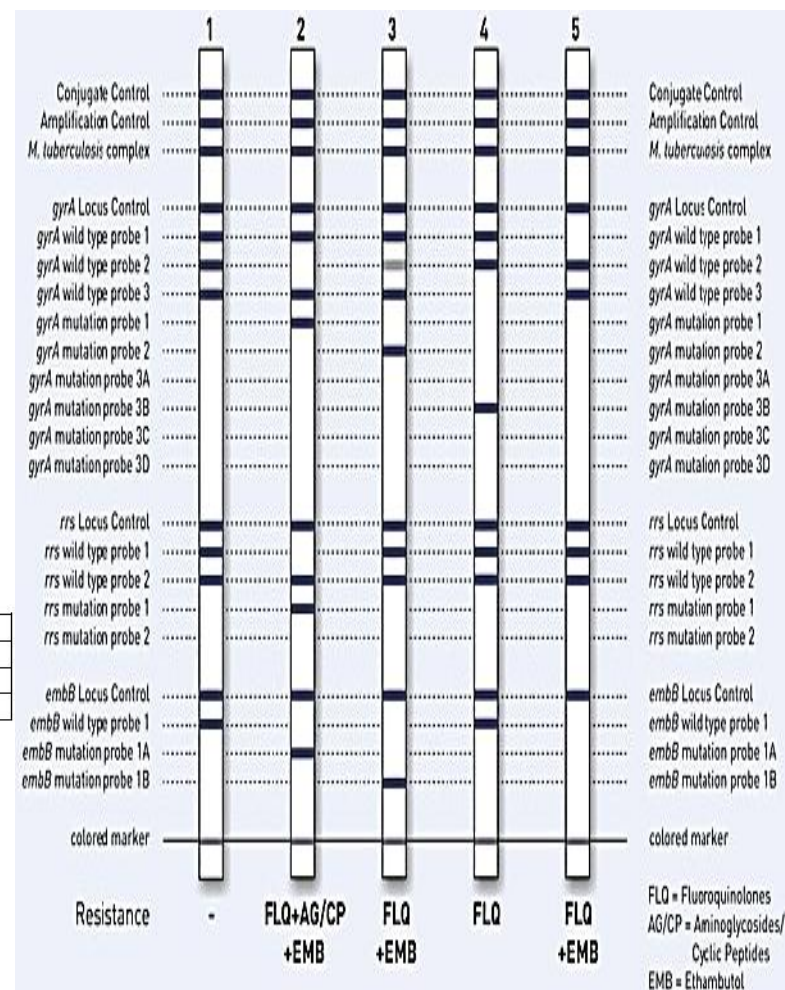
² This rare mutation has only been detected theoretically (*in silico*) yet. It is therefore possible that it cannot be detected *in vitro*.

Table 2: Mutations in the gene *rrs* and the corresponding wild type and mutation probes
(according to Maus *et al.* [Feb] 2005 and Maus *et al.* [Aug] 2005)

failing wild type probe(s)	codons analyzed	mutation probe	mutation	phenotypic resistance ³
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	CAP ^R , Vio ^S , AMK ^R , KAN ^R
<i>rrs</i> WT1	1402	-	C1402T	CAP ^R , Vio ^R , AMK ^S , KAN ^R
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	CAP ^R , Vio ^R , KAN ^R , AMK ^R

³ CAP: capreomycin, Vio: viomycin, KAN: kanamycin, AMK: amikacin

^R = resistance; ^S = sensitivity



THE USE OF MOLECULAR LINE PROBE ASSAY FOR THE DETECTION OF
RESISTANCE TO SECOND-LINE ANTI-TUBERCULOSIS DRUGS



Recomendaciones del Grupo de expertos

Genotype MTBDRsl **no debe reemplazar** las pbas fenotípicas convencionales de segunda línea

Recomendación fuerte - Muy baja calidad de la evidencia científica.

Observaciones:

1. **Puede ser** utilizado como pba rápida de TB XDR, pero no puede ser utilizado con fines de vigilancia epidemiológica.
2. La resistencia cruzada entre los inyectables de 2da línea es incompleta. Los valores de sensibilidad fueron heterogéneos para detección de Km en los estudios evaluados (ensayo insuficiente).
3. **No puede ser utilizada** para identificar fármacos individuales que se usarán en el tratamiento.
4. **Puede ser utilizada** para tomar precauciones en el control de infecciones previo confirmación a la pba fenotípica convencional.

Pruebas Moleculares

Ventajas:

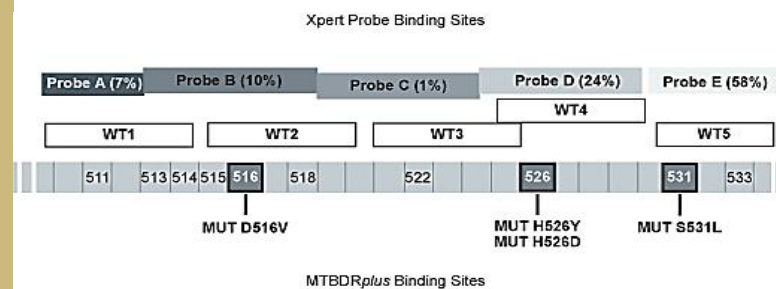
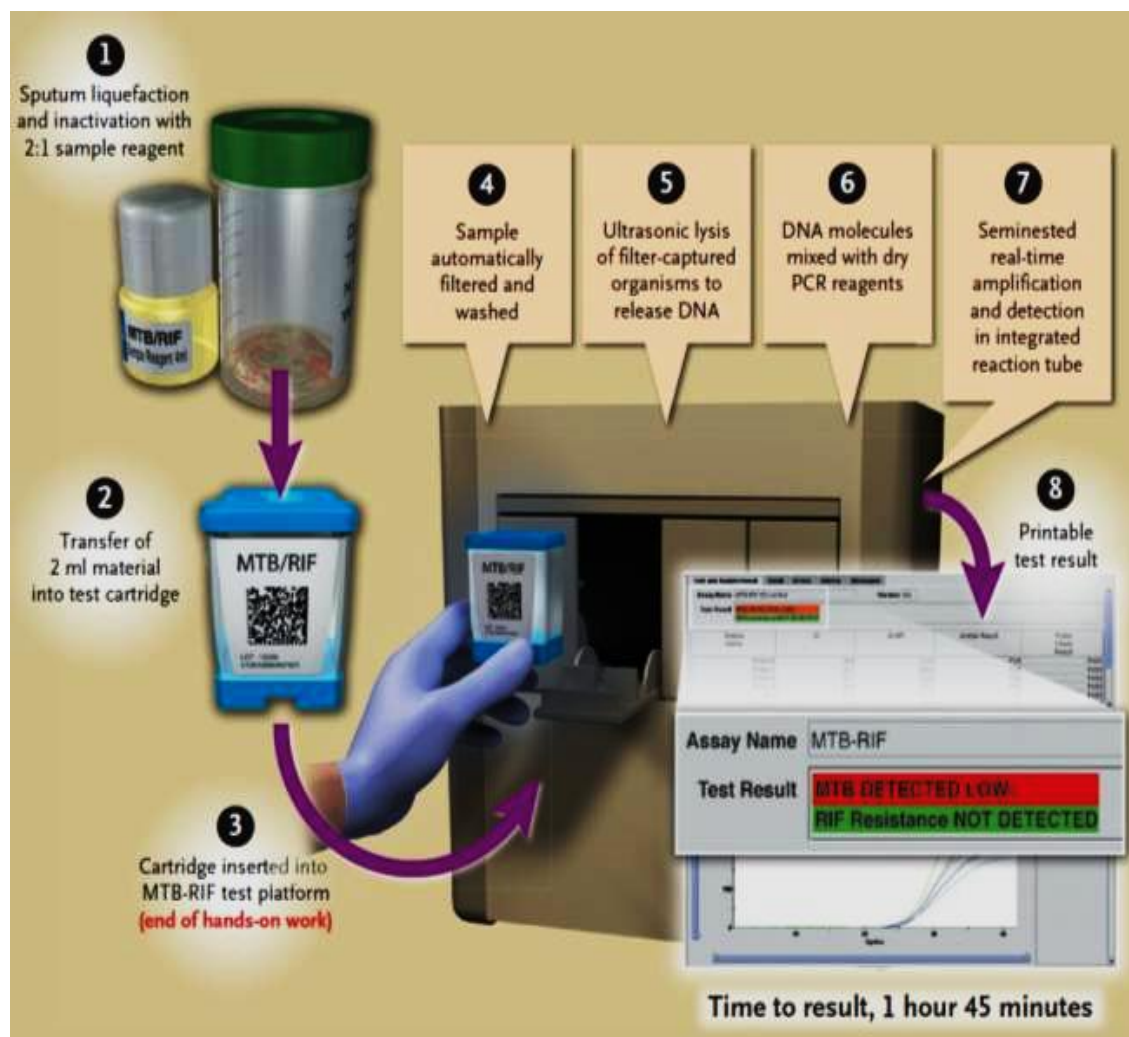
- Método comercial de precisión
- Resultados rápidos (hrs)
- Alta especificidad y sensibilidad para primera línea
- Contienen controles internos que las hace pruebas muy robustas

Desventajas:

- Costo
- Equipamiento
- Personal capacitado (interpretación de resultados)
- Infraestructura (control de amplicones)
- Bioseguridad



Xpert MTB/RIF



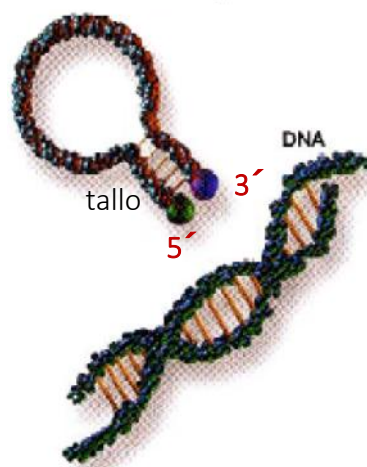
GeneXpert MTB/RIFqPCR semianidada

Molecular beacon (baliza molecular)

F Fluoróforo Ejemplo: Cy3 (Cyanine 3)

Q Extintor Ejemplo: BHQ (Black Hole Quenchers)

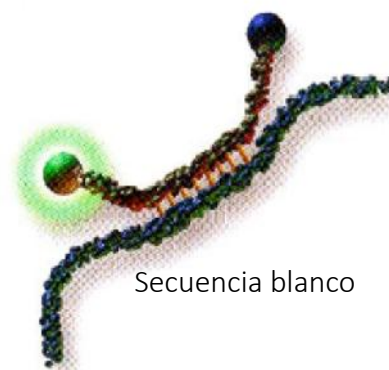
sonda



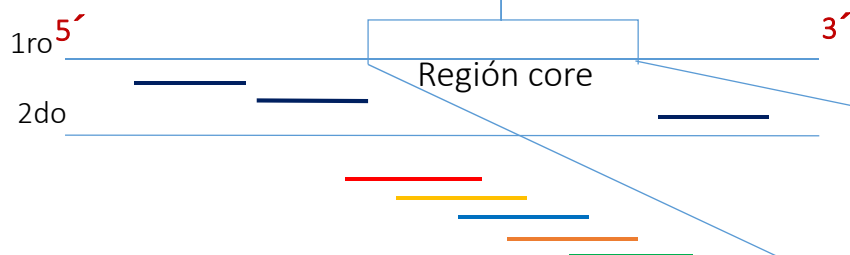
MOLECULAR BEACON



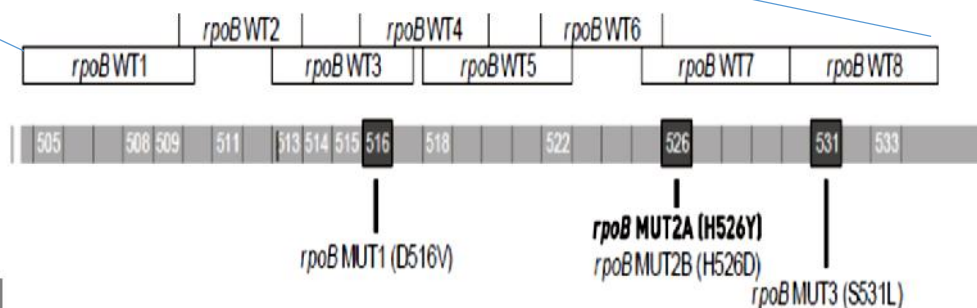
Emisión de fluorescencia



Fragmento del gen *rpoB* específico del CMTB



Oligobalizas para detectar mutaciones
en la RRDR (core)



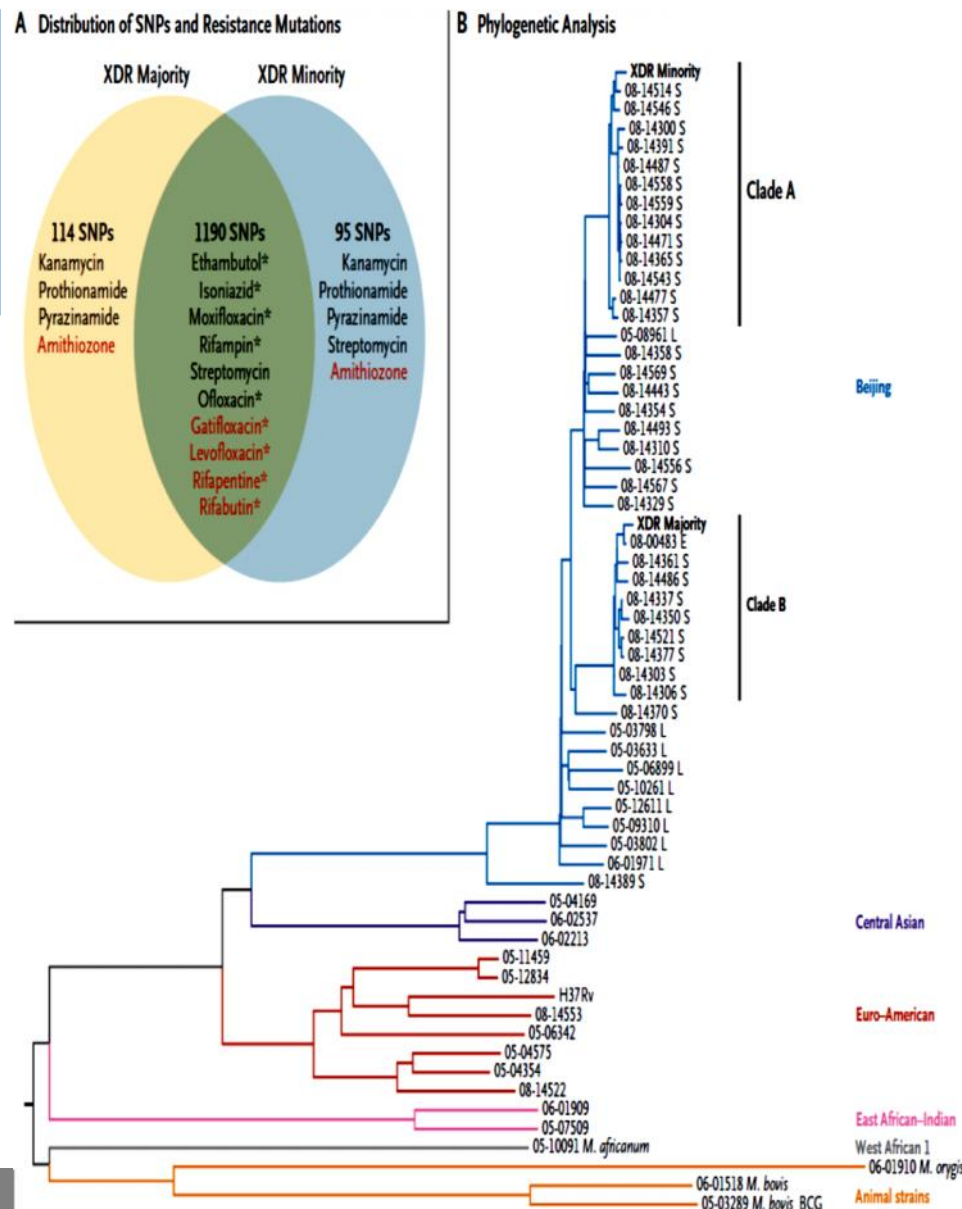
Secuenciación del genoma completo (WGS)

Secuenciación de un genoma bacteriano en menos de 1 día con costo de \$1320 por aislamiento bacteriano.

Relevante en control de infecciones y salud pública.

Datos genómicos pueden usarse para:

- Identificar micobacterias y su relación con otros mo. aislados de personas en el mismo hospital o de la comunidad (Análisis de brotes y patrones de transmisión)
- Tasa de mutación: Rastrear brotes futuros y calcular cuándo, y a través de que individuo se originaron para contener la propagación de cepas MDR, preXDR y XDR
- Identificar los organismos resistentes a múltiples fármacos para optimizar el Tx



Luchando contra una vieja enfermedad con la secuenciación de nueva generación (NGS)



ARTICLE

Received 27 Nov 2014 | Accepted 8 Apr 2015 | Published 11 May 2015

DOI: 10.1038/ncomms8119

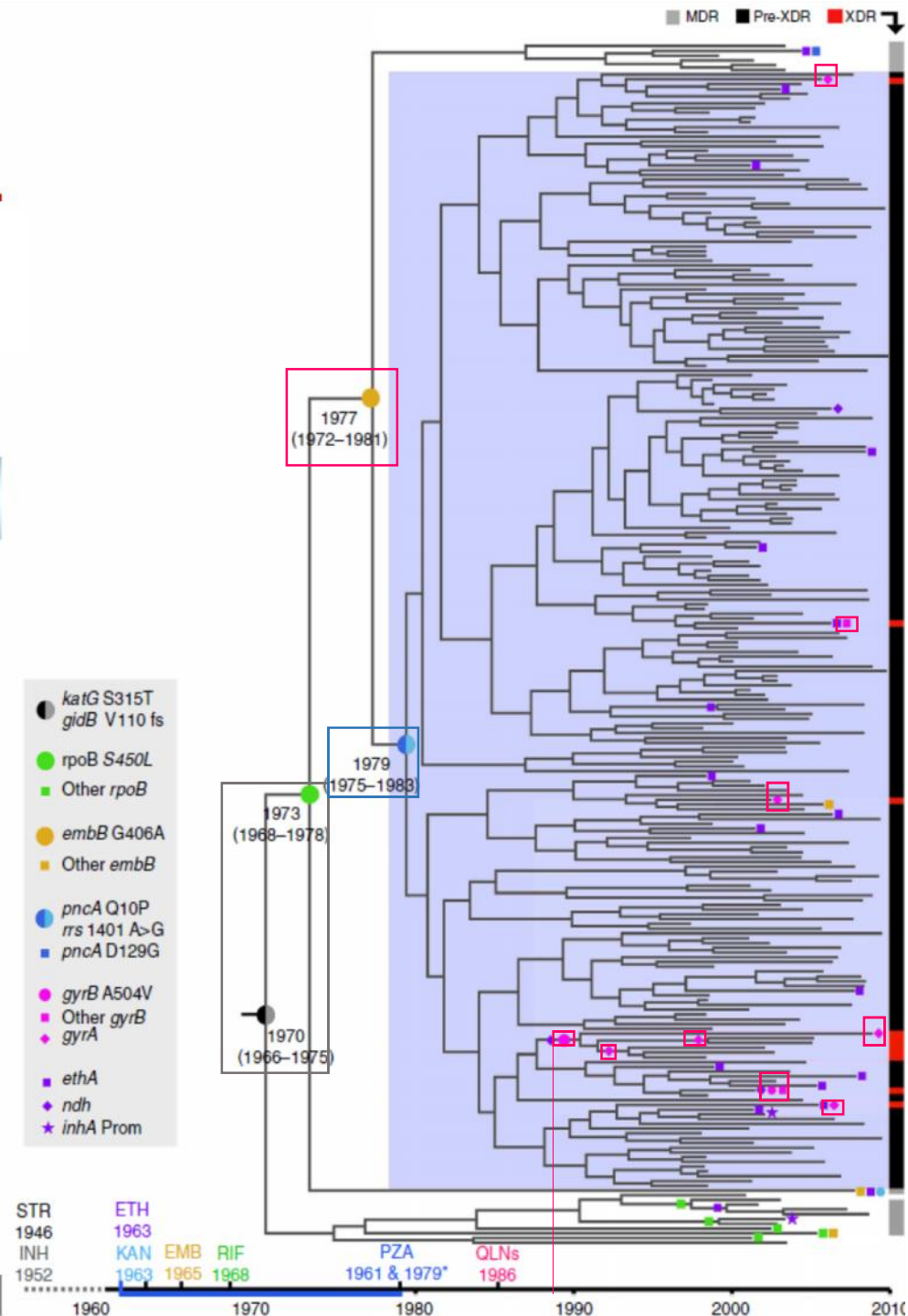
OPEN

Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain

Vegard Eldholm¹, Johana Monteserin^{2,*}, Adrien Rieux^{3,*}, Beatriz Lopez², Benjamin Sobkowiak³, Viviana Ritacco² & Francois Balloux³

progenitor of the outbreak strain acquired resistance to isoniazid, streptomycin and rifampicin by around 1973, indicating continuous circulation of a multidrug-resistant TB strain for four decades. By around 1979 the strain had acquired additional resistance to three more drugs. Our results indicate that *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) with extensive resistance profiles circulated 15 years before the outbreak was detected, and about one decade before the earliest documented transmission of *Mtb* strains with such extensive resistance profiles globally.

- *katG* S315T
gidB V110 fs
- *rpoB* S450L
- Other *rpoB*
- *embB* G406A
- Other *embB*
- *pncA* Q10P
rrs 1401 A>G
- *pncA* D129G
- *gyrB* A504V
- Other *gyrB*
- ◆ *gyrA*
- *ethA*
- ◆ *ndh*
- ★ *inhA* Prom



Plataformas automáticas o semi automáticas con o sin integración de análisis de AN de TB

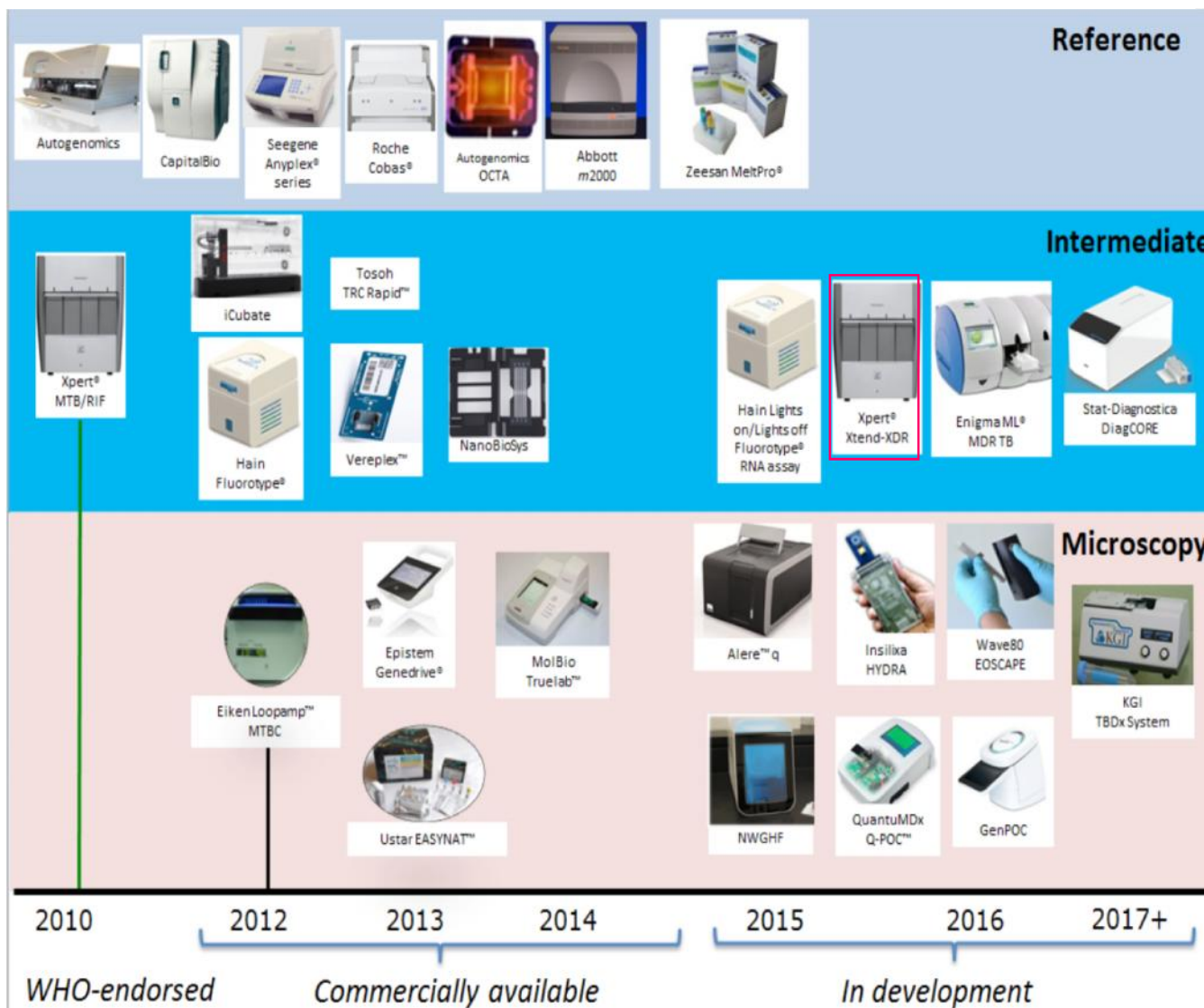


Table 3. TB diagnostic technologies endorsed by WHO

Year	Technology reviewed by WHO
2007	Commercial liquid culture and DST tools, and rapid speciation strip tests
2008	Molecular LPAs for first-line anti-TB drug resistance detection
2010	LED microscopy
2010	Selected non-commercial DST methods (MODS, CRI and NRA)
2010	Xpert® MTB/RIF
2013	Policy update on Xpert® MTB/RIF, with extension to childhood and EPTB

Source: WHO policies are available at http://www.who.int/tb/laboratory/policy_statements/en/.

Sólo el Xpert® MTB / RIF dentro de este grupo ha recibido la aprobación de la OMS

“Año 2015... sumemos esfuerzos para encontrar, tratar y curar a todos los enfermos de tuberculosis”

Dr. José Armando Martínez Guarneros

Responsable de las pruebas

de susceptibilidad de segunda línea

Laboratorio de Micobacterias del InDRE

armando.martinez@salud.gob.mx