



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



SALUD

SECRETARÍA DE SALUD

LXXIII Congreso de Neumología y Cirugía de Tórax

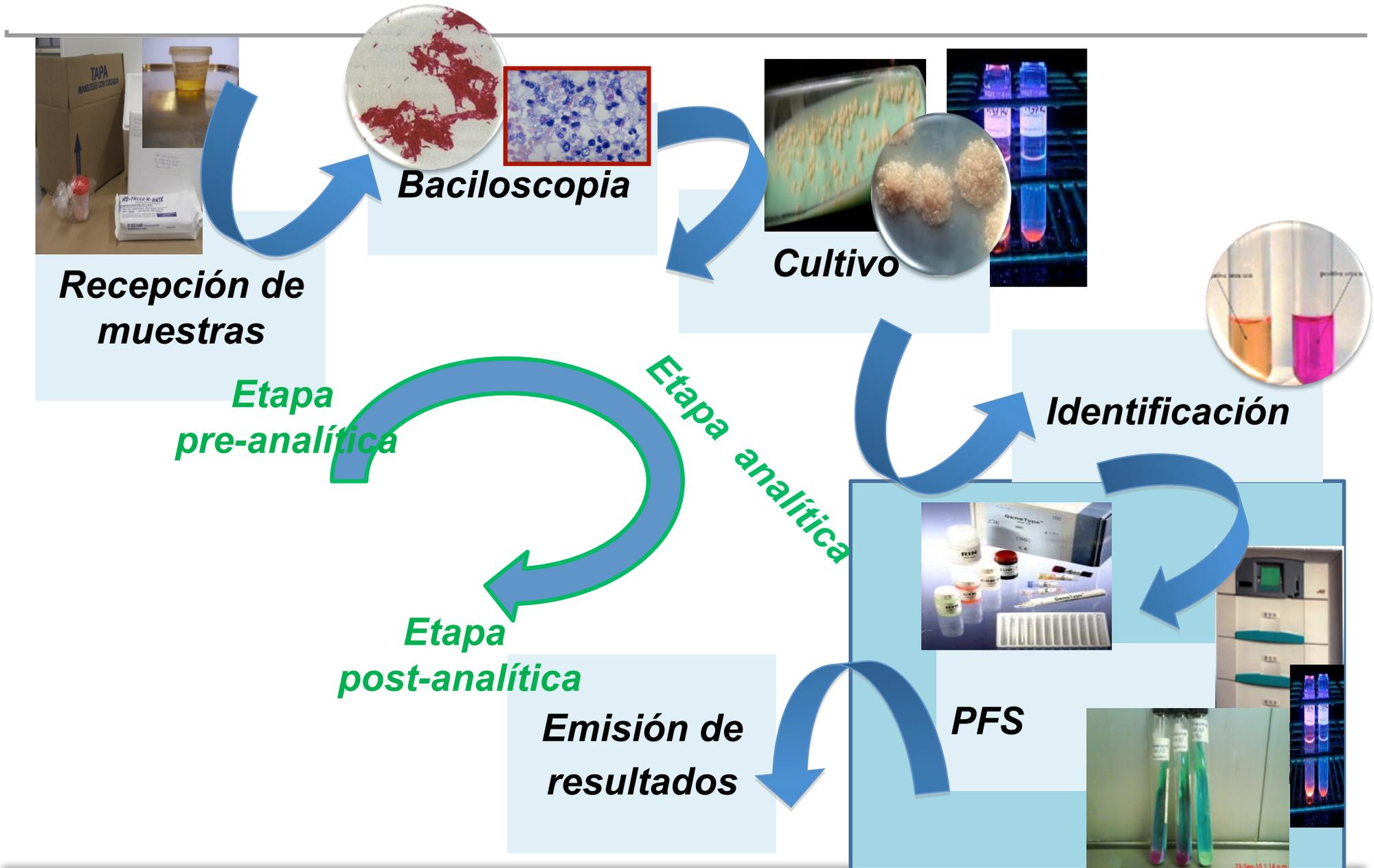
**Pruebas convencionales para detección de fármaco
resistencia vs nuevos métodos**

InDRE

Departamento de Bacteriología
Laboratorio de Micobacterias

Dra. Claudia E. Bäcker

Marco de referencia



Fenotípicos

- *Permite detectar la resistencia a una droga sin considerar el mecanismo o la base molecular (cómo se expresa).*
- *Se inocula una suspensión bacilar en un medio con fármacos antituberculosis para detectar crecimiento (resistencia) o inhibición de crecimiento(sensibilidad).*

Genotípicos

- *Identifican mutaciones moleculares asociadas con resistencia a una droga individual.*

PFS: métodos

Métodos Fenotípicos

Medio sólido o líquido: L.J., BBL.

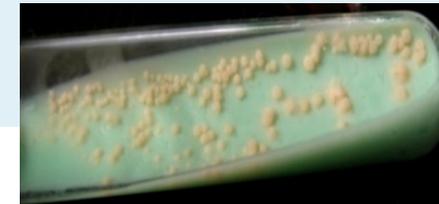
Tiempos de respuesta

Método de las Proporciones: 42 días
MGIT: 4 a 13 días.

• **Directos:** un grupo de medios con y sin droga es inoculado directamente a partir de una muestra concentrada.



• **Indirectos:** se realiza a partir de un cultivo puro que creció desde una muestra original.



Fenotípicos : proporciones, concentración absoluta y tasa de resistencia

PFS de primera línea



La exactitud de las PFS varía con las drogas probadas

PFS de primera línea: son más precisas para ISONIACIDA y RIFAMPICINA y menos seguras y reproducibles para estreptomicina, etambutol y pirazinamida.

Año	# Round	Estados invitados	Estados participantes
2010	1	Ags. Coah. Jal. N.L. Hgo. S.L.P. Ver (7)	Ags. N.L. S.L.P. Ver (4)
2011	2	Ags. BC (HGTijuana) Coah.Chih. Edomex.Jal. N.L. Hgo. S.L.P. Ver (9)	Ags. BC (HGTijuana).Chih.N. L. Hgo. S.L.P. Ver (7)
2012	3	Ags. BC (LESP Mexicali- HGTijuana) Coah. Chis. Chih. Edomex.Jal. N.L. S.L.P. Pue.Ver (11)	Ags. BC (LESP Mexicali- HGTijuana) Coah. Chis. Chih. Edomex.N.L. S.L.P. Pue.Ver (10)
2013	4	Ags. BC (LESP Mexicali- HGTijuana) Coah. Chis. Chih. Edomex.Jal. N.L. S.L.P. Pue.Ver (11)	Ags. BC (LESP Mexicali- HGTijuana) Coah. Chis. Chih. Edomex. N.L. S.L.P. Pue.Ver (11)

PFS de segunda línea

PFS de segunda línea: se estudio en el método de las proporciones en medio sólido y métodos líquidos comerciales.

Aminoglucósidos, polipéptidos y fluorquinolonas son confiables y reproducibles permitiendo un diagnóstico seguro del paciente XDR.

El resto de las drogas (etionamida, protionamida, cicloserina entre otras) No son recomendadas como confiables y reproducibles.

PFS de segunda línea



Requisitos para la implementación

- **Infraestructura**
- **Bioseguridad**
- **Aseguramiento de la calidad**
- **Capacidad para adquirir experiencia**

Amikacina, Kanamicina, Capreomicina y Ofloxacina.

Año	Número de Pruebas	CC OMS
2007	1	No
2008	15	No
2009	14	Si
2010	61	Si
2011	75	Si
2012	56	Si
2013	104	Si

PFS caseras vs comerciales

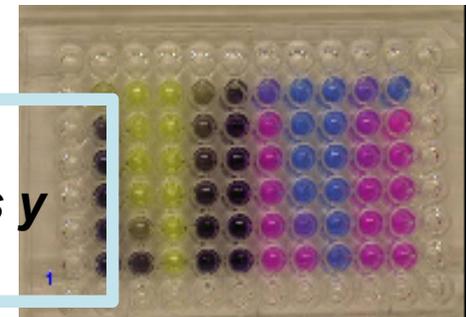


Cultivos y PFS comerciales son más caros que los no comerciales (MGIT, INNO-LIPA y XPERT-MTBRIF)

- **Cultivos y PFS no-comerciales son más propensos a errores cuando falta estandarización (variaciones locales en la metodología).**
- **La realización de estos métodos son dependientes del operador, de las buenas técnicas microbiológicas , y calidad asegurada y sostenida por adecuado entrenamiento.**



En ambos métodos debe haber rigurosos protocolos de laboratorio, procedimientos operacionales estandarizados y mecanismos de control de calidad internos.



MODS (Microscopic observation of drug susceptibility) Ensayo de susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica

Principio

La inoculación de una suspensión bacilar en medio líquido con y sin droga (I y R) seguido de la examinación con un microscopio óptico de luz invertida.

Puede ser directo o indirecto



***Tiempo de respuesta
5 a 21 días***

PFS métodos no comerciales MNR

MNR (Método Nitrato Reductasa)

Principio

El *M. tuberculosis* reduce el NO_3 a NO_2 por acción de la enzima nitrato reductasa. La reacción bioquímica se evidencia colocando una mezcla reveladora que manifiesta viabilidad bacteriana cambiando el color original a rosado.

Inoculación de suspensión bacilar en medio de LJ con KNO_3 con y sin droga.

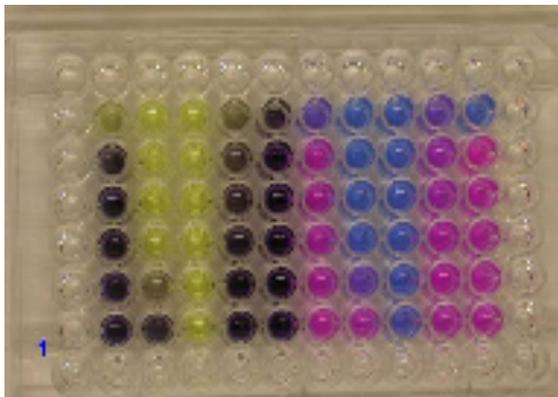


Tiempo de respuesta
Directo: 14 (21 o 28 días)
Indirecto: 7 (10 o 14 días)

CRI (Colorimetric redox indicator) Métodos colorimétricos

Principio

Se basa en la reducción (viabilidad bacteriana) de un indicador coloreado agregado al medio de cultivo líquido en una placa de microtitulación después de haber expuesto *in vitro* a cepas *M. tuberculosis* a drogas anti tb. Prueba indirecta.



Alamar Azul rosa
REMA rosa
MTT cristales púrpuras

Tiempo de respuesta
7 a 14 días

Relacion PFS fenotipicas vs genotípicas

Cultivos convencionales y Pruebas de Farmacosensibilidad (PFS) son procesos lentos. Requieren aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas, identificación y PFS.

Se estima que mas del 90% de las cepas resistentes a R también lo son a I (TB-MDR).

La resistencia a fármacos en tuberculosis es un fenómeno natural, el tratamiento inadecuado o inefectivo selecciona al mutante resistente.

La existencia de polirresistencia se deben a mutaciones en diferentes genes. Diferentes regiones de varios genes.

Marcadores genéticos de resistencia a Rifampicina

Rifampicina (R)

- **El gen *rpoβ* codifica la síntesis de la subunidad β de la ARN polimerasa.**
- **Los sitios más frecuentes de mutación en el gen *rpoβ* son en los codones 531, 526 y 516. Los sitios menos frecuentes son en los codones 511, 516, 518 y 522. En total puede haber hasta 50 sitios de mutación.**

- **La mutación en el gen *rpoβ* se asocia a resistencia a R en *M.tb*.**
- **Es una de las resistencias más comunes en algunas comunidades (95%).**

- **La R interfiere en la síntesis de ARN porque se une a la subunidad β de la ARN polimerasa bloqueando el alargamiento de la cadena de ARN.**

Marcadores genéticos de resistencia a Isoniacida

Isoniacida (I)

- ***La mutación en el gen katG es el principal mecanismo de resistencia a I (50 a 90%).***
- ***El gen katG codifica la síntesis de la enzima catalasa - peroxidasa.***
- ***El sitio mas común es katG S315T.***

***La mutación en el gen inhA es menos frecuente que la anterior (4 a 83%)
Resulta en un bajo nivel de resistencia a I.***

La I es un pro - fármaco que requiere la activación por medio de las enzima catalasa - peroxidasa del M.tb. Como fármaco ataca múltiples blancos del M. tb. Uno de ellos es la enzima InhA (enoyl-ACP-reductasa) que participa en el alargamiento de la cadena de ácidos grasos en la síntesis de acido micólico.

PCR (Polymerase chain reaction)

PRIMEROS PASOS

1. Extracción de los ácidos nucleicos a partir de muestra o cultivo. Dependiendo el umbral analítico del método puede hacerlo de muestras BK (+) o (-).

2. Amplificación de la secuencia diana: sucesivos ciclos de desnaturalización y naturalización del ADN. La separación de las cadenas permite que la Taq polimerasa forme copias de la zona diana genética en forma exponencial en cada ciclo. También se puede amplificar por transcripción inversa.

3. Detección de los fragmentos amplificados. En PCR caseras el fragmento amplificado se observa en un gel de agarosa luego de una electroforesis convencional. En las presentaciones comerciales se pone de manifiesto de manera automatizada, reacción colorimétrica, quimioluminiscencia o emisión de fluorescencia.

Numero de dobles cadenas de longitud correcta:

Primer ciclo

Segundo ciclo

Tercer ciclo

Cuarto ciclo

0

0

2

8

Line Probe Assay (LIPAs)



Extracción de ADN desde un aislado de *M.tb* (cultivo en medio sólido o líquido) o muestra.



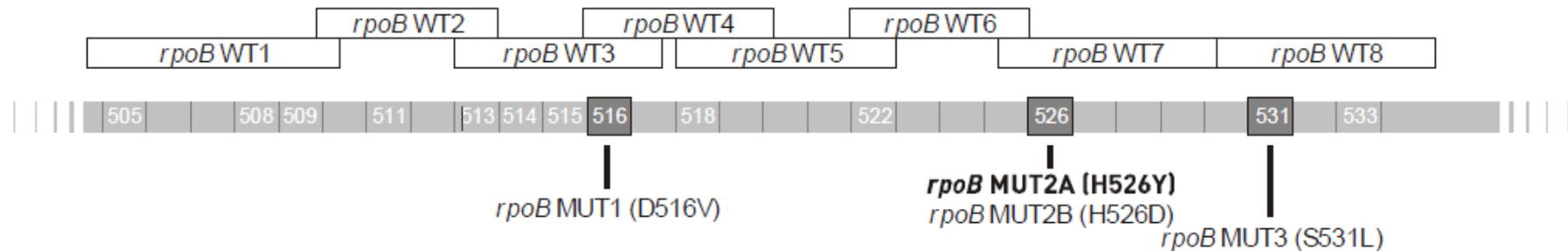
PCR Multiplex ,amplificación de la región que determina resistencia en el gen bajo cuestión con primers biotilonados.

Hibridación reversa los productos de PCR (amplicón) son hibridizados con sondas específicas de oligonucleótidos inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa desarrollando una reacción de color permitiendo la detección de CMTB así como la presencia del tipo salvaje (sensible) y de sondas para la mutaciones de resistencia.

Interpretación dependiente del operador (visual).

Región de resistencia a Rifampicina del gen *rpoB*

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



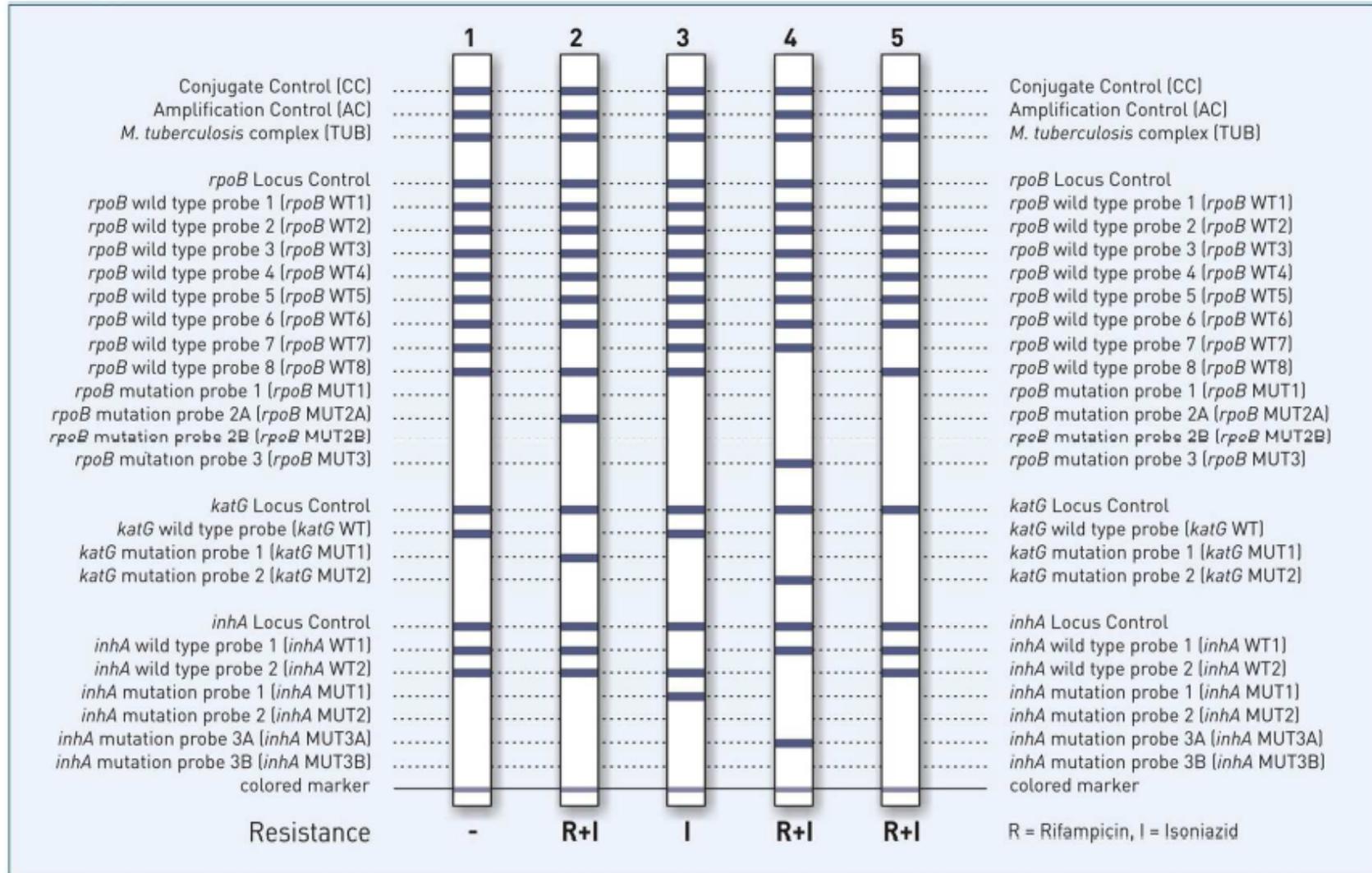
rpoB-Wildtype-probes: WT 1 to WT 8

rpoB-Mutation-probes: MUT D516V, H526Y, H526D, S531L

Detección de mutaciones por ausencia de señales wildtype

Detección de mutaciones por presencia de señales de mutación

Ejemplos de interpretación



Line Probe Assay (LIPAs)



Eur Respir J 2008; 32: 1165–1174
DOI: 10.1183/09031936.00061808
Copyright © ERS Journals Ltd 2008



GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis

D.I. Ling*, A.A. Zwerling* and M. Pai*[#]

ABSTRACT: The global extensively drug-resistant tuberculosis (TB) response plan calls for implementation of rapid tests to screen patients at risk of drug-resistant TB. Currently, two line probe assays exist, the INNO-LiPA[®]Rif.TB assay (Innogenetics, Ghent, Belgium) and the GenoType[®] MTBDR assay (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Germany). While LIPA studies have been reviewed, the accuracy of GenoType assays has not been systematically reviewed.

The present authors carried out a systematic review and used meta-analysis methods appropriate for diagnostic accuracy. After the literature searches, 14 comparisons for rifampicin and 15 comparisons for isoniazid were identified in 10 articles that used GenoType MTBDR assays. Accuracy results were summarised in forest plots and pooled using bivariate random-effects regression.

The pooled sensitivity (98.1%, 95% confidence interval (CI) 95.9–99.1) and specificity (98.7%, 95% CI 97.3–99.4) estimates for rifampicin resistance were very high and consistent across all subgroups, assay versions and specimen types. The accuracy for isoniazid was variable, with lower sensitivity (84.3%, 95% CI 76.6–89.8) and more inconsistent than specificity (99.5%, 95% CI 97.5–99.9).

GenoType MDTBR assays demonstrate excellent accuracy for rifampicin resistance, even when used on clinical specimens. While specificity is excellent for isoniazid, sensitivity estimates were modest and variable. Together with data from demonstration projects, the meta-analysis provides evidence for policy making and clinical practice.

KEYWORDS: Diagnostic accuracy, drug resistance, line probe assay, multidrug-resistant tuberculosis, sensitivity and specificity, tuberculosis

Droga	Sensibilidad	IC95%	Especificidad	IC95%
Rifampicina	98.10%	95.9 a 99.1%	98.70%	97.3 a 99.4%
Isoniacida	84.30%	78.6 a 89.8%	99.50%	97.5 a 99.9 %

CONTRIBUTORS:
M. Pai, Dept of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Health, McGill University, and
*Respiratory Epidemiology and Clinical Research Unit, Montreal Chest Institute, Montreal, QC, Canada.

CORRESPONDENCE:
M. Pai
Dept of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Health
McGill University
1020 Pine Avenue West
Montreal
QC H3A 1A2
Canada
Fax: 1 5143984503
E-mail: madhukar.pai@mcgill.ca

Received:
April 23 2008
Accepted after revision:
June 27 2008

SUPPORT STATEMENT:
The present study was supported by funding from the World Health

El GenoType MDTBDR tiene una excelente exactitud para detectar resistencia en Rifampicina (aislamientos y muestras clínicas) . Mientras que la especificidad es excelente para Isoniacida, la sensibilidad encontrada fue variable y modesta.

Consideraciones para implementar (1)

• **Recolección , almacenamiento y transporte de muestras**

Debe cumplir con los mismo requisitos que el de una muestra para cultivo o PFS.

• **Bioseguridad**

Gabinete de Bioseguridad (GBS) para manejo del material biológico (muestra: digestión, descontaminación y concentración de la muestra previo a la extracción de ADN).

• **Diseño del laboratorio**

Precauciones extremas para reducir el riesgo de contaminación cruzada. Considerar cuartos para extracción de ADN, preparación de reactivos para PCR (pre-amplificación), PCR e hibridación , e interpretación de resultados (post amplificación). Definir un flujo de trabajo unidireccional, limpieza meticulosa y acceso restringido. Suministro eléctrico permanente.

• **Comercial vs casero**

A la fecha ningún LIPA casero ha sido correctamente validado por lo tanto no se recomienda su uso.



Consideraciones para implementar (2)

- **Calidad de los reactivos y vida útil**

Se debe seguir las indicaciones del fabricante.

La vida media de Genotype MTBDR plus es de 18 meses.

- **Equipo**

GBS y centrifuga (muestra).

Termociclador, plataforma de agitación, baño María, microcentrifugas, y consumibles entre otros.

Incubadoras y sistemas de hibridación automáticas deben ser específicos.

- **RRHH y entrenamiento**

El éxito en la implementación e interpretación de LIPAS es altamente dependiente de la habilidad del personal del laboratorio para realizar la prueba y la calidad de supervisión.

Se recomienda personal calificado con experiencia en biología molecular que pueda acceder a supervisiones (remotas o in situ)



Consideraciones finales



- ***Puede realizarse a partir de un aislamiento o muestra pulmonar BK (+).***
- ***El tiempo de emisión de resultado es de 6 a hs a 2 días.***
- ***No reemplaza al cultivo convencional ni a las PFS. El cultivo se necesita para las muestras BK (-) y las PFS de segunda línea.***
- ***Es una prueba cara (inversión inicial alta) y necesita para su implementación un laboratorio con cierta infraestructura y personal calificado.***

Marcadores genéticos de resistencia a fármacos de segunda línea (1)



Fluorquinolonas (FQs)

- **Los genes *gyrA* y *gyrB* codifican las sub-unidades A y B de la enzima ADN girasa .**
- **La mutación del gen *gyrA* es más común que la del *gyrB* .**
- **La frecuencia de estas mutaciones en las cepas de *M. tb* resistentes a fluorquinolonas están presentes en un rango de 43 a 94%.**
- **En el *M.tb* las FQs actúan en la enzima ADN girasa inhibiendo la síntesis de ADN.**

Marcadores genéticos de resistencia a fármacos de segunda línea (2)

Aminoglucósidos Kanamicina (Km) Amikacina (Am)

El gen *rrs* codifica al 16S rARN que participan en la síntesis de proteína.

La Km y la Am son aminoglucosidos que inhiben la síntesis de proteínas, y el sitio de acción para ambos son en el 16S rARN.

- **Mutaciones asociadas en el gen *rrs* y en el gen *rpsL*.**
- **El gen *rpsL* codifica la proteína S12.**
- **La mutación en el gen *rpsL* representa aproximadamente el 50% de la resistencia a S y la mutación en el gen *rrs* el 20%.**
- **S inhibe la síntesis proteica en el *M.tb* por unión a la subunidad 30S ribosomal (específicamente en las proteínas S12 y 16S rARN) resultando en una mala lectura del mARN durante la traducción.**

Estreptomycin (S)

Marcadores genéticos de resistencia a fármacos de segunda línea (3)



Capreomicina (Cm)

- El gen *rrs* codifica al 16S rARN que participan en la síntesis de proteína.**
- La Cm inhiben la síntesis de proteínas actuando en 16S rARN y 23S rARN .**
- Las mutaciones en el16S rARN (gen *rrs*) son asociadas con resistencia a Km, Am y Cm, mientras la mutación en el gen *tlyA* es asociada con resistencia a Cm.**
- Existen frecuencias variables de resistencia cruzada entre Km, Am y Cm dependiendo de los sitios de mutación.**

Marcadores genéticos de resistencia a fármacos de segunda línea (3)

Etambutol

- El gen *embB* codifica la enzima arabinosiltransferasa.**
- La frecuencia de mutación en el gen *embB* en las cepas de *M.tb* resistente se presenta entre un 47 a 65%. Pero una proporción importante de cepas de *M.tb* resistentes no tienen la mutación en ese gen, faltando aun identificar donde se encuentra.**
- El E inhibe la biosíntesis de la pared celular en *M.tb* al actuar en la enzima arabinosiltransferasa que participa en la polimerización de arabinana, arabinogalactana y lipoarabinomana.**

Marcadores genéticos de resistencia a fármacos de segunda línea



- *Presentan sensibilidad moderada para la detección de FQs e inyectables a 2L y especificidad alta.*
- *Los valores de sensibilidad fueron heterogéneos para detección de Km en los estudios revisados (ensayo insuficiente).*
- *La resistencia cruzada entre los inyectables de segunda línea es incompleta, el Genotype MTBDRsl no debe ser usado para identificar fármacos individuales para el tratamiento.*
Se necesita entender más la discordancia que puede haber entre estas pruebas y las fenotípicas

El Genotype MTBDRsl no reemplaza a las PFS 2L fenotípicas convencionales.

PCR semianidado a tiempo real para detección de MTB y Resistencia a Rifampicina (1)

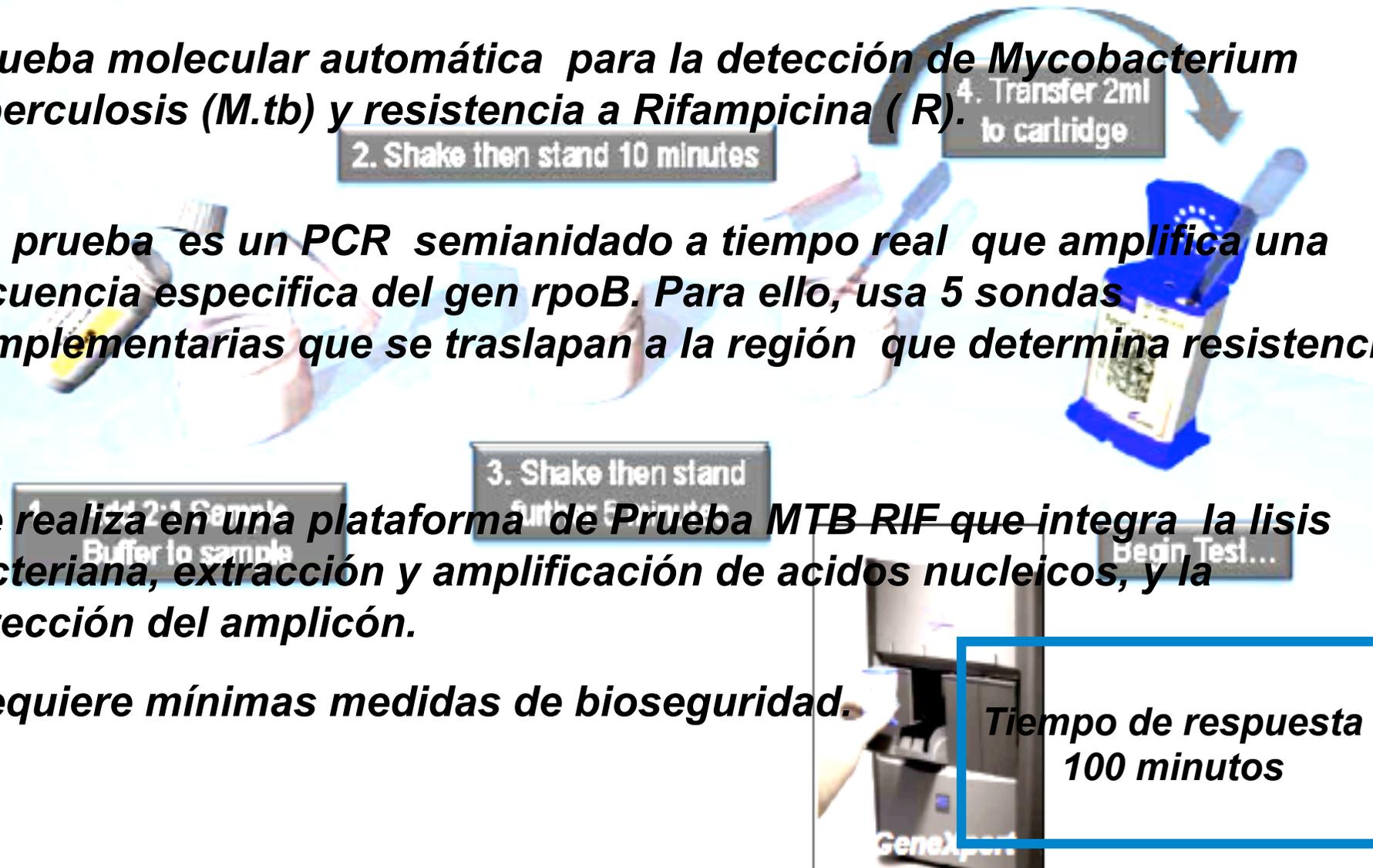
• Prueba molecular automática para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) y resistencia a Rifampicina (R).

• La prueba es un PCR semianidado a tiempo real que amplifica una secuencia específica del gen *rpoB*. Para ello, usa 5 sondas complementarias que se traslapan a la región que determina resistencia.

• Se realiza en una plataforma de Prueba MTB RIF que integra la lisis bacteriana, extracción y amplificación de ácidos nucleicos, y la detección del amplicón.

• Requiere mínimas medidas de bioseguridad.

Tiempo de respuesta
100 minutos



PCR semianidado a tiempo real para detección de MTB y Resistencia a Rifampicina (2)

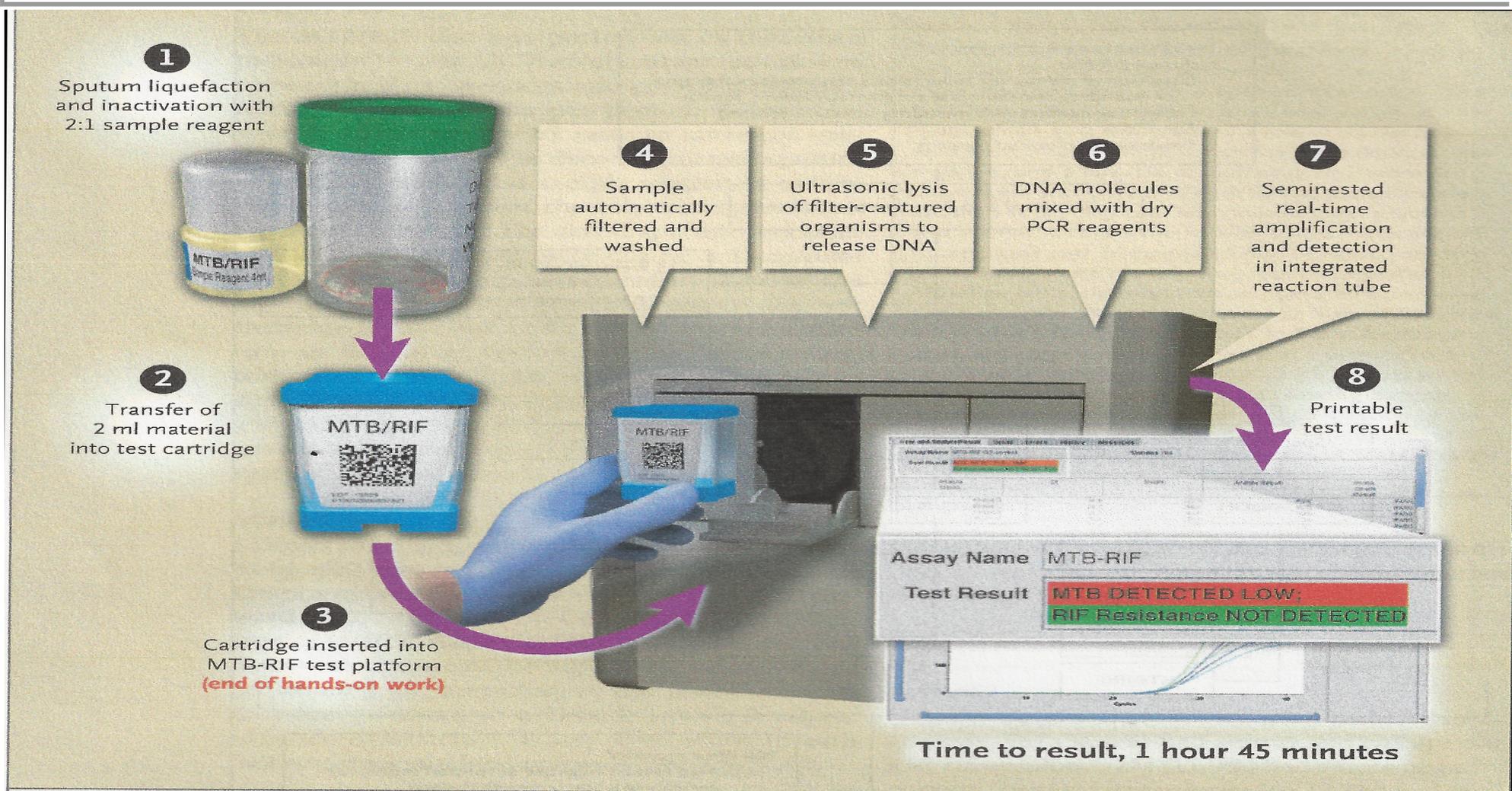


Figure 2. Assay Procedure for the MTB/RIF Test.

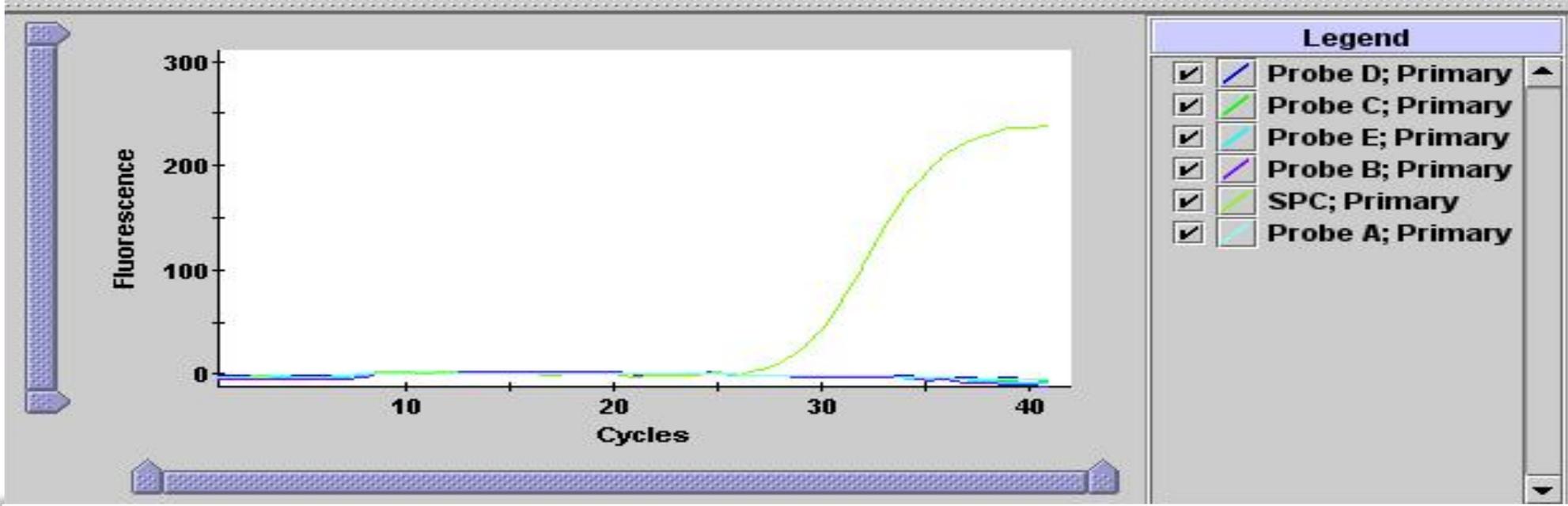
Two volumes of sample treatment reagent are added to each volume of sputum. The mixture is shaken, incubated at room temperature for 15 minutes, and shaken again. Next, a sample of 2 to 3 ml is transferred to the test cartridge, which is then loaded into the instrument. All subsequent steps occur automatically. The user is provided with a printable test result, such as “MTB detected; RIF resistance not detected.” PCR denotes polymerase chain reaction.

Test and Analyte Result | **Detail** | **Errors** | **History** | **Messages**

Assay Name MTB-RIF PEO Assay v.1 **Version** NA

Test Result **MTB NOT DETECTED**

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	0.0	-5.0	NEG	PASS
Probe C	0.0	-7.0	NEG	PASS
Probe E	0.0	-9.0	NEG	PASS
Probe B	0.0	-11.0	NEG	PASS
SPC	28.8	238.0	PASS	PASS
Probe A	0.0	-5.0	NEG	PASS





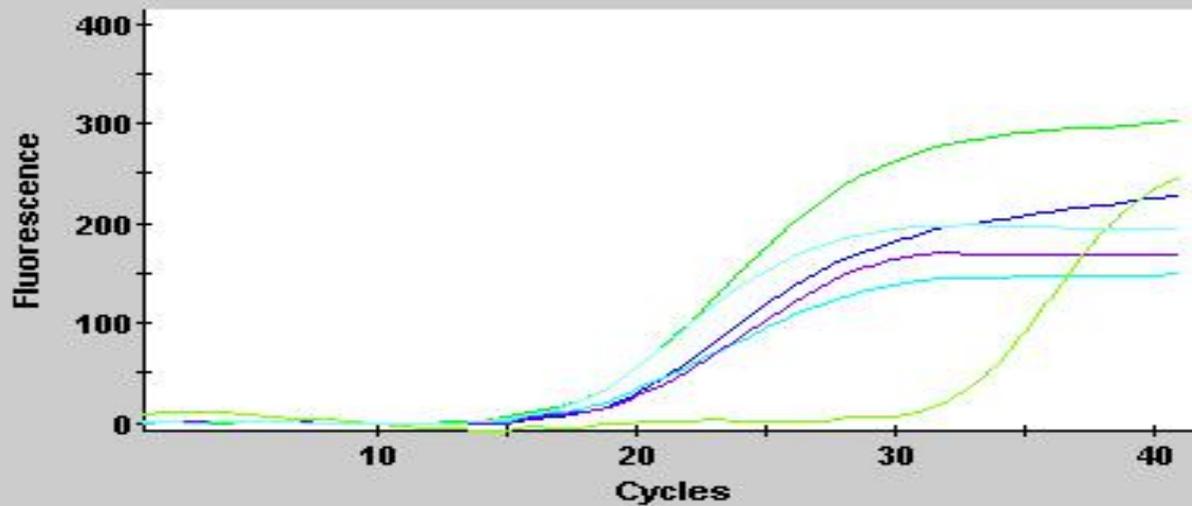
Test and Analyte Result Detail Errors History Messages

Assay Name: MTB-RIF PEO Assay v.1

Version: NA

Test Result: **MTB DETECTED MEDIUM;**
Rif Resistance NOT DETECTED

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	19.3	228.0	POS	PASS
Probe C	17.6	303.0	POS	PASS
Probe E	18.8	149.0	POS	PASS
Probe B	19.4	168.0	POS	PASS
SPC	31.9	246.0	NA	PASS
Probe A	17.7	194.0	POS	PASS



- Legend**
- ▬ Probe D; Primary
 - ▬ Probe C; Primary
 - ▬ Probe E; Primary
 - ▬ Probe B; Primary
 - ▬ SPC; Primary
 - ▬ Probe A; Primary

Create Test
Check Status
Stop Test
View Results
Define Assays
Define Graphs
Maintenance

Module Name B1

Sample ID
TBV 18074

Assay Xpert MTB-RIF Assay G4

Version 5

Reagent Lot ID* 12408

Test Type Specimen

Sample Type Other

Other Sample Type

Notes

Start Time 01/04/14 18:40:02

End Time 01/04/14 20:21:46

Status Done

User Eric Ramos

Views

Result View

Primary Curve

Test Result | **Analyte Result** | **Detail** | **Errors** | **History** | **Support**

Assay Name Xpert MTB-RIF Assay G4 **Version** 5

Test Result **MTB DETECTED HIGH;
Rif Resistance DETECTED**

For In Vitro Diagnostic Use Only.

Views

Result View

Primary Curve

Cycles	Probe D; Primary	Probe C; Primary	Probe E; Primary	Probe B; Primary	SPC; Primary	Probe A; Primary	QC-1; Primary	QC-2; Primary
0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
20	100	150	120	100	50	100	100	100
30	250	280	150	120	100	150	150	150
40	350	380	150	120	100	150	150	150

Legend

- █ Probe D; Primary
- █ Probe C; Primary
- █ Probe E; Primary
- █ Probe B; Primary
- █ SPC; Primary
- █ Probe A; Primary
- █ QC-1; Primary
- █ QC-2; Primary

Save Changes
Export
Report
Select Graphs
View Test

PCR semianidado a tiempo real para detección de MTB y Resistencia a Rifampicina (2)

SEUD
SECRETARÍA DE SALUD



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

SEPTEMBER 9, 2010

VOL. 363 NO. 11

Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance

Catharina C. Boehme, M.D., Pamela Nabeta, M.D., Doris Hillemann, Ph.D., Mark P. Nicol, Ph.D., Shubhada Shenai, Ph.D., Fiorella Krapp, M.D., Jenny Allen, B.Tech., Rasim Tahirli, M.D., Robert Blakemore, B.S., Roxana Rustomjee, M.D., Ph.D., Ana Milovic, M.S., Martin Jones, Ph.D., Sean M. O'Brien, Ph.D., David H. Persing, M.D., Ph.D., Sabine Ruesch-Gerdes, M.D., Eduardo Gotuzzo, M.D., Camilla Rodrigues, M.D., David Alland, M.D., and Mark D. Perkins, M.D.

ABSTRACT

BACKGROUND

Global control of tuberculosis is hampered by slow, insensitive diagnostic methods, particularly for the detection of drug-resistant forms and in patients with human immunodeficiency virus infection. Early detection is essential to reduce the death rate and interrupt transmission, but the complexity and infrastructure needs of sensitive methods limit their accessibility and effect.

METHODS

We assessed the performance of Xpert MTB/RIF, an automated molecular test for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and resistance to rifampin (RIF), with fully integrated sample processing in 1730 patients with suspected drug-sensitive or multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. Eligible patients in Peru, Azerbaijan, South Africa, and India provided three sputum specimens each. Two specimens were processed with *N*-acetyl-L-cysteine and sodium hydroxide before microscopy, solid and liquid culture, and the MTB/RIF test, and one specimen was used for direct testing with microscopy and the MTB/RIF test.

RESULTS

Among culture-positive patients, a single, direct MTB/RIF test identified 551 of 561 patients with smear-positive tuberculosis (98.2%) and 124 of 171 with smear-negative tuberculosis (72.5%). The test was specific in 604 of 609 patients without tuberculosis (99.2%). Among patients with smear-negative, culture-positive tuberculosis, the addition of a second MTB/RIF test increased sensitivity by 12.6 percentage points and a third by 5.1 percentage points, to a total of 90.2%. As compared with phenotypic drug-susceptibility testing, MTB/RIF testing correctly identified 200 of 205 patients (97.6%) with rifampin-resistant bacteria and 504 of 514 (98.1%) with rifampin-sensitive bacteria. Sequencing resolved all but two cases in favor of the MTB/RIF assay.

CONCLUSIONS

The MTB/RIF test provided sensitive detection of tuberculosis and rifampin resistance directly from untreated sputum in less than 2 hours with minimal hands-on time. (Funded by the Foundation for Innovative New Diagnostics.)

From the Foundation for Innovative New Diagnostics, Geneva (C.C.B., P.N., M.D.P.); Forschungszentrum Borstel, Borstel, Germany (D.H., S.R.-G.); the Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Cape Town, and National Health Laboratory Service, Cape Town (M.P.N., A.M.), and the Unit for Clinical and Biomedical TB Research, South African Medical Research Council, Durban (J.A., R.R.) — all in South Africa; P.D. Hinduja National Hospital and Medical Research Centre (Hinduja), Mumbai, India (S.S., C.R.); Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru (F.K., E.G.); Special Treatment Institution, Baku, Azerbaijan (R.T.); the Division of Infectious Diseases, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark (R.B., D.A.); Cepheid, Sunnyvale, CA (M.J., D.H.P.); and the Department of Biostatistics and Bioinformatics, Duke University Medical Center, Durham, NC (S.M.O.). Address reprint requests to Dr. Boehme at the Foundation for Innovative New Diagnostics, Ave. de Budé 16, 1202 Geneva, Switzerland, or at catharina.boehme@finddiagnostics.org.

This article (10.1056/NEJMoa0907847) was published on September 1, 2010, at NEJM.org.

N Engl J Med 2010;363:1005-15.
Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society.

N ENGL J MED 363;11 NEJM.ORG SEPTEMBER 9, 2010

1005

PCR semianidado a tiempo real para detección de MTB y Resistencia a Rifampicina (3)



Table 2. Overall Sensitivity and Specificity of the MTB/RIF Test, According to the Number of Tests per Patient, as Compared with Three Smears and Four Cultures.*

Site and No. of Tests	Sensitivity			Specificity
	All Culture-Positive	Smear-Positive and Culture-Positive	Smear-Negative and Culture-Positive	No Tuberculosis
Site				
Lima, Peru				
Correct — no./total no. (%)	209/211 (99.1)	199/199 (100)	10/12 (83.3)	102/102 (100)
95% CI	96.6–99.7	98.1–100.0	55.2–95.3	96.4–100.0
Baku, Azerbaijan				
Correct — no./total no. (%)	144/149 (96.6)	80/80 (100.0)	64/69 (92.8)	68/70 (97.1)
95% CI	92.4–98.6	95.4–100.0	84.1–96.9	90.2–99.2
Cape Town, South Africa				
Correct — no./total no. (%)	142/148 (95.9)	95/96 (99.0)	47/52 (90.4)	186/189 (98.4)
95% CI	91.4–98.1	94.3–99.8	79.4–95.8	95.4–99.5
Durban, South Africa				
Correct — no./total no. (%)	43/45 (95.6)	30/30 (100.0)	13/15 (86.7)	213/219 (97.3)
95% CI	85.2–98.8	88.6–100.0	62.1–96.3	94.2–98.7
Mumbai, India				
Correct — no./total no. (%)	185/188 (98.4)	162/162 (100.0)	23/26 (88.5)	35/36 (97.2)
95% CI	95.4–99.5	99.7–100.0	71.0–96.0	85.8–99.5
No. of MTB/RIF tests				
3 Samples (2 pellet and 1 direct)				
Correct — no./total no. (%)	723/741 (97.6)	566/567 (99.8)	157/174 (90.2)	604/616 (98.1)
95% CI	96.2–98.5	99.0–100.0	84.9–93.8	96.6–98.9
2 Samples (1 pellet and 1 direct)				
Correct — no./total no. (%) †	1423/1482 (96.0)	1127/1134 (99.4)	296/348 (85.1)	1215/1232 (98.6)
95% CI	94.6–97.1	98.6–99.7	79.7–89.2	97.5–99.2
1 Sample (direct)				
Correct — no./total no. (%)	675/732 (92.2)	551/561 (98.2)	124/171 (72.5)	604/609 (99.2)
95% CI	90.0–93.9	96.8–99.0	65.4–78.7	98.1–99.6

* Site-specific performance is shown for three MTB/RIF test results per patient (two pellet samples plus one direct sample). The sensitivity of the test did not differ significantly between patients who were suspected of having pulmonary tuberculosis and those suspected of having multidrug-resistant tuberculosis ($P=0.96$). (For details, see Table 3 in the Supplementary Appendix.) Of 105 patients with culture-negative samples who were treated for tuberculosis on the basis of clinical symptoms, 29.3% had positive results on the MTB/RIF test (data not shown), but no further analysis was done during this study.

† The denominator for patients with two tests includes two observations per patient. The first observation is a combination of the first sputum sample (pellet) and third sputum sample (direct). The second observation is a combination of the second sputum sample (pellet) and the third sputum sample (direct). The calculation of the confidence interval (CI) accounts for within-patient correlation and the use of the third sputum sample two times.

PCR semianidado a tiempo real para detección de MTB y Resistencia a Rifampicina (4)



Table 3. Sensitivity and Specificity of the MTB/RIF Test for the Detection of Rifampin and Multidrug Resistance, as Compared with Phenotypic Drug-Susceptibility Testing Alone and in Combination with Sequencing of Discrepant Cases, According to Site.*

Site and Total	Phenotypic Drug-Susceptibility Testing†		Phenotypic Drug-Susceptibility Testing and Discrepant Resolution by Sequencing†	
	Sensitivity for Rifampin Resistance	Specificity for Rifampin Resistance	Sensitivity for Rifampin Resistance	Specificity for Rifampin Resistance
Lima, Peru — no./total no. (%)	16/16 (100.0)	190/193 (98.4)	19/19 (100.0)	190/190 (100.0)
Baku, Azerbaijan — no./total no. (%)	47/49 (95.9)	90/94 (95.7)	51/52 (98.1)	90/90 (100.0)
Cape Town, South Africa — no./total no. (%)	15/16 (93.8)	126/126 (100.0)	15/15 (100.0)	126/126 (100.0)
Durban, South Africa — no./total no. (%)	3/3 (100.0)	38/38 (100.0)	3/3 (100.0)	38/38 (100.0)
Mumbai, India — no./total no. (%)	119/121 (98.3)	61/64 (95.3)	121/122 (99.2)	62/62 (100.0)
Total for rifampin resistance				
Correct — no./total no. (%)	200/205 (97.6)	505/515 (98.1)	209/211 (99.1)	506/506 (100.0)
95% CI — %	94.4–99.0	96.5–98.9	96.6–99.7	99.2–100.0
Total for multidrug resistance				
Correct — no./total no. (%)	195/200 (97.5)		197/199 (99.0)	
95% CI — %	94.3–98.9		96.4–99.7	

* Multidrug resistance is defined as resistance to both rifampin and isoniazid. Of 723 culture-positive samples, 720 were analyzed for rifampin resistance because results on the MTB/RIF test were indeterminate in 3 cases. During blinded sequencing of 15 discrepant samples, *rpoB* mutations were identified in 9 samples that were rifampin-sensitive on phenotypic drug-susceptibility testing. A wild-type allele was identified in 1 sample, which had been reported as resistant on phenotypic drug-susceptibility testing. Mixed infections were identified in 3 samples and were excluded from the analysis after discrepant resolution. In 2 samples, sequencing confirmed the phenotypic result: *rpoB* mutation 516 GTC was detected in 1, and 531 TTG in the other.

† This is the reference standard for the comparison with the MTB/RIF test.



Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis

•Diagnóstico de TBP

Sensibilidad 90,4% (IC95% 89.2 a 91.4%)

Especificidad 98.4% (IC95% 98 a 98.7%)

Kai Chang^a, Weiping Lu^a, Junji Wang, Kejun Zhang, Shuangrong Jia, Fake Li, Shaoli Deng, Ming Chen*

•Diagnóstico de Resistencia a RIF en TBP

Sensibilidad 94,1% (IC95% 91,6 a 96 %)

Especificidad 97 % (IC95% 96 a 97.7%)

Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, The Third Military University, Chongqing 400042, China

Accepted 21 February 2012
Available online ■ ■ ■

KEYWORDS

Xpert MTB/RIF assay;
Tuberculosis;
Rifampicin resistance;
Meta-analysis

Summary Objectives: Xpert MTB/RIF (Cepheid) assay has been introduced for the diagnosis of tuberculosis (TB) and RIF-resistance. The meta-analysis was used to establish the overall accuracy of Xpert MTB/RIF assay for diagnosing TB and RIF-resistance.

Methods: Based on comprehensive searches of the Pubmed and Embase, we identified outcome data from all articles estimating diagnostic accuracy with Xpert MTB/RIF assay. A summary estimation for sensitivity, specificity, diagnostic odds ratios (DOR) and the area under the summary ROC curve (AUC) was calculated by using the bivariate random-effects approach.

Results: The meta-analysis included 18 studies (10,224 suspected specimens). The summary estimate was 90.4% (95%CI 89.2%–91.4%) for sensitivity, 98.4% (95%CI 98.0%–98.7%) for specificity and 328.3/0.9822 for DOR/AUC in pulmonary tuberculosis (PTB). The sensitivity and DOR/AUC of detecting RIF-resistance were 94.1%, 97.0% and 177.8/0.9832, respectively. For extrapulmonary tuberculosis, the overall pooled sensitivity was 83.3% and specificity was 86.1%. The findings in subgroup analysis were as follows: the accuracy of Xpert MTB/RIF assay is higher in smear-positive specimens and the sensitivity of diagnosing PTB in adults was higher than that in children (90.8% versus 74.3%).

Conclusions: TB and RIF-resistance can be rapidly and effectively diagnosed with Xpert MTB/RIF assay.

© 2012 Published by Elsevier Ltd on behalf of The British Infection Association.

•Diagnóstico de TBP con coafección con VIH

Sensibilidad 81.7% (IC95% 77a 85.8%)

Especificidad 98% (IC95% 96.6 a 98.9%)

* Corresponding author. Tel.: +86 23 68757601; fax: +86 23 68716530.

E-mail address: chenming1971@yahoo.com (M. Chen).

^a These authors contributed equally to this work as the co-first author.

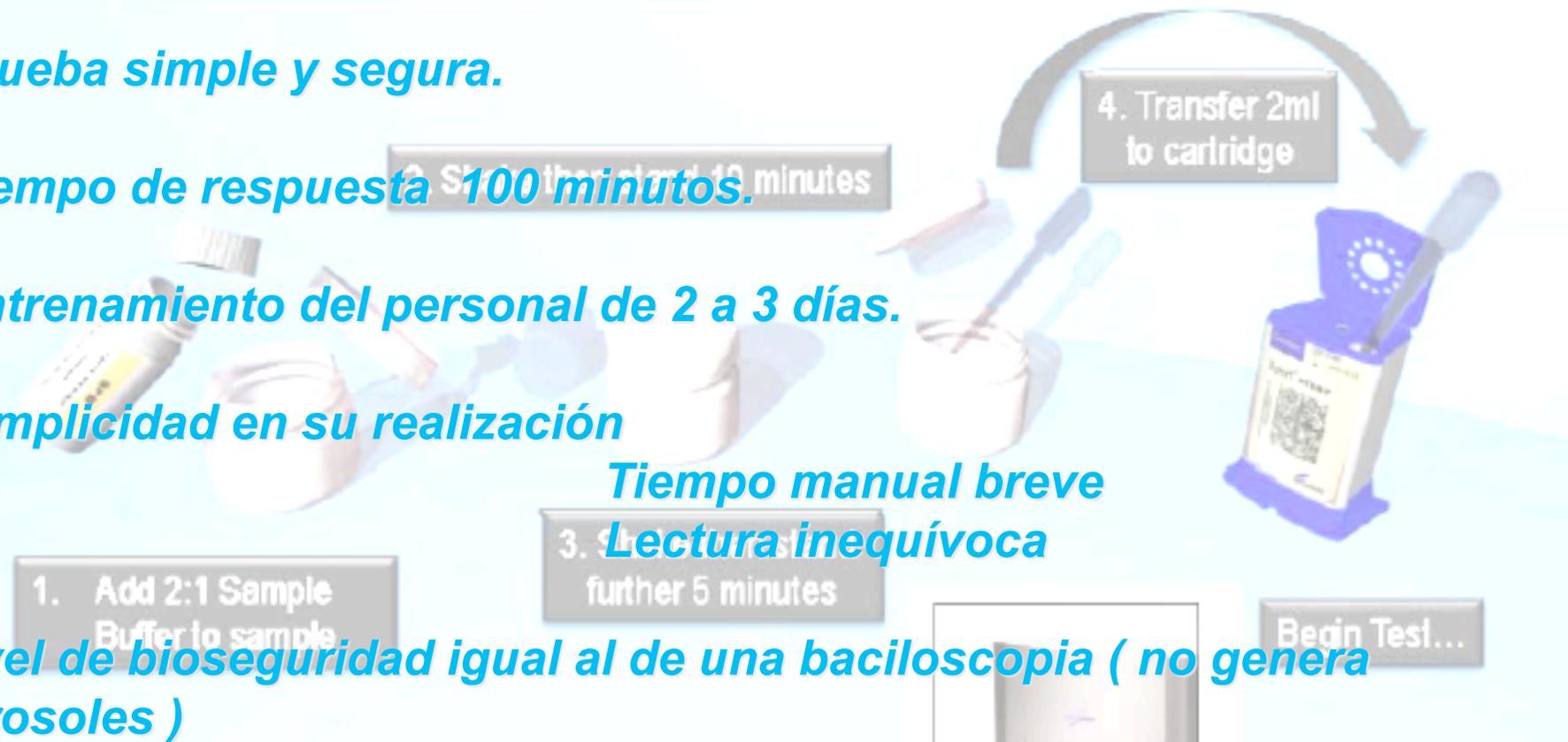
•Diagnóstico para TBEP

Sensibilidad 80.4% (IC95% 75 a85.1%)

Especificidad 86.1% (IC95% 83.5 a 88.4%)

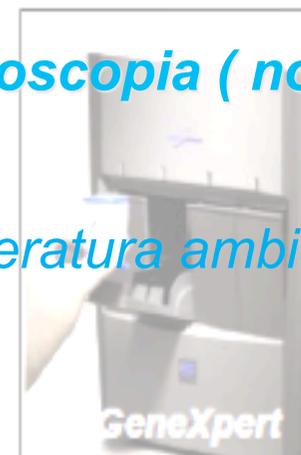
PCR semianidado a tiempo real para detección de MTB y Resistencia a Rifampicina

- Prueba simple y segura.
- Tiempo de respuesta **100 minutos.**
- Entrenamiento del personal de 2 a 3 días.
- Simplicidad en su realización



Nivel de bioseguridad igual al de una baciloscopia (no genera aerosoles)

- Garantizar suministro de electricidad y temperatura ambiental necesaria
- Calibración anual remota o en el lugar.
- Suministro de cartuchos.



Métodos moleculares : PFS



- ***Sirven para descentralizar el manejo programático de la farmacorresistencia en tb.***
- ***Ofrecen un diagnóstico rápido.***
- ***Pruebas estandarizadas.***
- ***Tienen un potencial alto.***
- ***Algunos bajo nivel de bioseguridad.***

iiiiiiGraciasiiiiiiii
