

Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias

José Domínguez, Silvia Blanco, Alicia Lacoma, Nerea García-Sierra, Cristina Prat y Vicente Ausina

Servei de Microbiologia. Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España. CIBER Enfermedades Respiratorias. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España. Departament de Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

Las micobacterias constituyen un grupo de bacterias de gran interés en medicina, ya que, junto a especies telúricas y oportunistas, se hallan 2 especies (*Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*) de gran importancia en salud pública. A pesar de los esfuerzos realizados para su control, la tuberculosis (TB) sigue siendo en la actualidad uno de los problemas sanitarios de más trascendencia mundial.

En los últimos años, la micobacteriología ha experimentado importantes avances tecnológicos. A pesar de ello, el diagnóstico temprano de la infección por micobacterias y, especialmente de la TB, sigue recayendo en el examen microscópico de las muestras teñidas de manera adecuada. En la actualidad, éste sigue siendo el procedimiento más simple, de mejor coste-efectividad y rapidez para proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar.

El control efectivo de la TB se basa en la detección rápida de *M. tuberculosis*, seguido por la inmediata implementación del tratamiento antituberculoso adecuado. La emergencia de cepas resistentes a los fármacos antituberculosos agudiza la necesidad de disponer de métodos rápidos de detección de *M. tuberculosis* y de resistencias. La disponibilidad de métodos de epidemiología molecular de fácil implementación y estandarización, que nos permitan identificar casos relacionados, es fundamental para identificar brotes epidémicos que ayuden a controlar la propagación de la TB.

Aun reconociendo los evidentes progresos realizados en el diagnóstico molecular de las infecciones micobacterianas, las técnicas disponibles son todavía insuficientes. En esta revisión, describimos el estado actual de las principales técnicas moleculares para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas, para su identificación, detección de resistencias a los principales fármacos antituberculosos y de epidemiología molecular. En cada caso, destacamos las ventajas y las limitaciones de ellas.

En un próximo futuro la micobacteriología clínica evolucionará, con bastante probabilidad, hacia la universalización de las técnicas genéticas aplicadas al diagnóstico directo y la detección de resistencias. La epidemiología molecular de la TB se realizará, en sus diferentes aplicaciones, con técnicas más rápidas y automatizadas que las actuales.

Palabras clave: Micobacterias. Detección directa. Identificación. Detección de resistencias. Epidemiología molecular.

Utility of molecular biology in the microbiological diagnosis of mycobacterial infections

Species within the *Mycobacterium* genus are of major medical interest, since, together with environmental and opportunistic species, there are two species (*Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*) that remain an important public health challenge. Despite efforts to control tuberculosis (TB), this disease remains one of the most prominent health problems worldwide. In the last few years, mycobacteriology has experienced major technological advances. Nevertheless, the early diagnosis of mycobacterial infection and, especially of TB, is still based on microscopic examination of properly stained samples. At present, this procedure is still the simplest, fastest and most cost-effective method for preliminary diagnostic guidance. Effective control of TB is based on rapid detection of *M. tuberculosis*, followed by immediate implementation of the appropriate antituberculosis therapy. Because of the emergence of multidrug resistant strains, the development of rapid diagnostic methods, both for identification of *M. tuberculosis* and susceptibility testing, has become a pressing need. The availability of molecular epidemiology methods that are easy to implement and standardized and that would allow identification of related cases is of key importance to identify epidemic outbreaks and control the spread of TB. Despite the evident progress in the molecular diagnosis of mycobacterial infections, the available techniques are still inadequate. In this review, we describe the state of the art of the main molecular

Correspondencia: Dr. V. Ausina.
Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.
Carretera del Canyet, s/n. 08916. Badalona. Barcelona. España.
Correo electrónico: vausina.germanstrias@gencat.net

techniques for direct detection of mycobacteria in clinical samples, their identification, detection of resistance to the most important antituberculosis agents, and molecular epidemiology. In each case, we describe the advantages and limitations of current techniques. In the near future, clinical mycobacteriology will probably evolve to the universal use of genetic techniques for direct diagnosis and detection of resistance. The molecular epidemiology of TB will be performed, in its various applications, by faster and more automated techniques than those currently available.

Key words: Mycobacteria. Direct detection. Identification. Resistance detection. Molecular epidemiology.

Introducción

Las infecciones por micobacterias continúan siendo causa de una elevada morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, con 9 millones de casos de tuberculosis (TB) activa y más de 1,7 millones de muertes cada año¹. Estas cifras, lejos de disminuir, aumentan, así como el número de cepas resistentes a los fármacos antituberculosos de primera línea. El problema de la TB es particularmente grave en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad ha aumentado en nuestro medio en los últimos años. Primero como consecuencia de la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana, y, posteriormente, por el incremento de los núcleos de población marginales y las corrientes migratorias procedentes de países con una incidencia alta de la enfermedad. En España, se estima que cada año aparecen unos 10.000 casos nuevos de TB, hecho que supone una tasa de incidencia global de 25 por 100.000 habitantes, de los cuales un 1% corresponde a cepas multirresistentes. De estos casos, la mitad son bacilíferos, es decir, con capacidad de contagio.

Un factor esencial en el control de la expansión de la TB radica en la capacidad de diagnosticar la enfermedad en sus primeras fases. Los métodos microbiológicos de referencia en el diagnóstico de la TB continúan siendo el examen microscópico, el cultivo y el aislamiento de *M. tuberculosis*. Sin embargo, como es bien conocido, las técnicas actualmente disponibles son insuficientes para las necesidades de la clínica. Las técnicas de examen microscópico presentan una sensibilidad baja y las técnicas de cultivo en medio sólido son lentas, por lo que se requieren periodos de incubación de hasta 2 meses. Además, los métodos de identificación tradicionales son laboriosos y lentos. La incorporación de nuevos medios líquidos adaptados a equipos automatizados ha permitido reducir el tiempo de aislamiento. Además, la utilización de sistemas automatizados en medio líquido para el estudio de la sensibilidad a los antituberculosos permite disponer de los resultados en 15-20 días desde el aislamiento de la cepa de *M. tuberculosis*².

Desde su aparición, las técnicas basadas en la biología molecular se han considerado como una alternativa a los métodos convencionales. Por sus características intrínse-

cas, estas técnicas moleculares nos deberían ayudar a reducir el tiempo de diagnóstico, a realizar la identificación y a detectar las resistencias más frecuentes de forma rápida y, además, a realizar estudios de epidemiología molecular. A continuación, se detallan las principales técnicas disponibles para el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias, y se presta una atención especial a las orientadas al diagnóstico y tratamiento de la TB.

Detección directa de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas

En los últimos años, se han desarrollado y evaluado un gran número de técnicas para detectar micobacterias, fundamentalmente *M. tuberculosis*, directamente de muestras clínicas. En estas técnicas, tanto de desarrollo caseo como comercializadas, se amplifican diferentes dianas genéticas y se utilizan distintos métodos de amplificación y de revelado del producto amplificado. Es necesario señalar que la sensibilidad de estas técnicas es dependiente en gran medida de la utilización de métodos optimizados y correctamente estandarizados para extraer el material genético, y que es recomendable emplear técnicas que incluyan controles internos de amplificación para detectar las posibles inhibiciones.

Técnicas de amplificación no comerciales

Se han descrito diferentes protocolos de técnicas no comerciales basadas en la amplificación de diferentes secuencias diana (IS6110, *hsp65*, MBP64 o *rpoB*) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o *nested-PCR*. El revelado del producto amplificado se realiza mayoritariamente mediante electroforesis en gel de agarosa. Recientemente, en un metaanálisis, en el que se comparaban las técnicas no comerciales de amplificación, se señalaba que la amplificación de IS6110 mediante *nested-PCR* era la que presentaba un rendimiento mejor³.

Sistemas de amplificación estandarizados y disponibles comercialmente

Técnicas de amplificación y revelado automatizado o semiautomatizado

Las técnicas más ampliamente utilizadas son, por un lado, el Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Assays-AMTD2 (Gen-Probe Incorporated, San Diego, Estados Unidos)⁴⁻⁸ y LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay (Abbott Laboratories, Illinois, Estados Unidos)^{9,10}, que son técnicas semiautomatizadas; y, por otro lado, las técnicas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test y COBAS Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Roche Molecular Diagnostics, California, Estados Unidos)¹¹⁻¹⁴ y BD ProbeTec™ ET assay (BD Biosciencias, Sparks, Md. Estados Unidos)^{13,15-17}, que son técnicas totalmente automatizadas. En la tabla 1 se muestra la diana que se amplifica en cada sistema, el método de detección y los valores de sensibilidad y especificidad para las diferentes técnicas, tanto en muestras respiratorias como extrarrespiratorias. La mayoría de los estudios demuestra que la especificidad de estas técnicas es aceptable tanto en muestras respiratorias como extrarrespiratorias, mientras que la sensibilidad es variable, encontrando siempre la mayor

TABLA 1. Diana de amplificación, método de detección y valores de sensibilidad y especificidad tanto en muestras de origen respiratorio como extrarrespiratorio de las técnicas de amplificación comercializadas

Técnica	Diana de amplificación	Método de detección	Sensibilidad en muestras respiratorias (%)	Sensibilidad en muestras extrarrespiratorias (%)	Especificidad global (%)
AMTD2	16S rARN	Quimioluminiscencia	80-100	60-90	95-100
LCx	Proteína antigénica b	Fluorométrica	80-90	65-80	90-100
AMPLICOR	16S rARN	Colorimétrica	75-100	45-60	90-100
BD ProbeTec	IS6110 y 16S rARN	Fluorométrica	55-100	30-80	45-100
INNO-LIPA v2	IR16S-23S	Colorimétrica	50-95	60-80	90-100
GenoType Direct	23S rARN	Colorimétrica	60-95	60-80	95-100
RT-PCR	16S rARN	Fluorométrica	70-90	65-85	85

rARN: receptor del ácido ribonucleico; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

sensibilidad en muestras respiratorias con baciloscopia positiva. En este sentido hay aún gran controversia sobre su utilidad real en muestras con baciloscopia negativa.

Técnicas de amplificación y revelado por hibridación en fase sólida

En estas técnicas, la detección del producto amplificado se realiza mediante sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) específicas fijadas en tiras de nitrocelulosa. Fundamentalmente, hay técnicas comercializadas, la primera de las cuales es el INNO-LIPA *Mycobacteria* v2 (Innogenetics N. V., Gante, Bélgica), que, a pesar de que se desarrolló para identificar *M. tuberculosis* y otras especies micobacterianas a partir de aislamientos, también ha demostrado ser útil en la detección directa de muestra clínica, especialmente en muestras respiratorias con baciloscopia positiva¹⁸. La segunda técnica es el GenoType *Mycobacteria* Direct (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania) que detecta la presencia de *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense* y *M. tuberculosis* complex con una buena sensibilidad¹⁹. Estas técnicas, a pesar de que son laboriosas y no están automatizadas, presentan la ventaja de que son capaces de detectar en el mismo ensayo otras especies micobacterianas, además de *M. tuberculosis*.

PCR en tiempo real

Estas técnicas se basan en la amplificación y la detección del amplificado de forma simultánea. Se utilizan sondas complementarias a las secuencias de interés. Al ir marcadas con fluorocromos, a medida que se amplifica el fragmento seleccionado, se detecta la emisión de fluorescencia. Las sondas más empleadas son las TaqMan, Beacon y FRET. La detección de *M. tuberculosis* por PCR en tiempo real directamente de muestra clínica puede disminuir el tiempo de detección e identificación a unas 3 h en total, y es más sencilla de realizar que las técnicas citadas anteriormente. En estas técnicas, al no ser necesaria la manipulación del producto amplificado, se minimizan los problemas de contaminación.

Por el momento, no hay estudios suficientes para poder determinar la verdadera utilidad de las técnicas de PCR en tiempo real comercializadas, como son *Mycobacterium tuberculosis* TM PCR kit (Artus GmbH, Hamburgo, Alemania)²⁰, RealAccurate™ *Mycobacterium tuberculosis* PCR Kit (Pathofinder, Maastricht, Países Bajos), MTBC-RealCycler (Ingenie Molecular, Progenie Molecular, Valencia, España) y COBAS TaqMan MTB Test (Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, Estados Unidos), aun-

que los datos disponibles parecen indicar que son técnicas sensibles y con una buena especificidad.

Identificación

Sondas de ácidos nucleicos

Las primeras sondas comerciales no radiactivas disponibles fueron las de AccuProbe (Gen-Probe Incorporated, San Diego, Estados Unidos). El uso de estas sondas de ADN complementarias al ácido ribonucleico (ARN) ribosómico micobacteriano, marcadas con quimioluminiscencia, permite identificar *M. tuberculosis*, el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii* a partir de cultivo sólido y líquido, sin necesidad de amplificación genómica. Esta técnica presenta una buena sensibilidad y especificidad, pero el número de especies que identifica es limitado²¹. Alternativamente, también se han diseñado sondas fluorescentes de ácidos nucleicos peptídicos (Dako Probe MTB Culture Confirmation Test, Dako, Dinamarca) que permiten diferenciar entre micobacterias del complejo *M. tuberculosis* del resto de micobacterias²².

Técnicas de amplificación genómica

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han resultado de gran utilidad para identificar micobacterias, y la mayoría de ellas permite realizar la identificación en unas pocas horas. Se pueden aplicar tanto a cepas aisladas en cultivo sólido, como a partir de medios líquidos. A continuación detallamos algunas de las técnicas más utilizadas en función del método de revelado.

Hibridación en fase sólida

Estas técnicas se basan en la amplificación de una secuencia diana, y su posterior hibridación, en tiras de nitrocelulosa marcadas con sondas específicas para las diferentes especies que se quiera identificar. Estas técnicas son rápidas y de fácil interpretación. En estos momentos, disponemos de 2 sistemas comercializados: INNO-LIPA v2 (espacio intergénico 16S-23S)^{23,24} y GenoType (23S rRNA). INNO-LIPA v2 incluye 16 sondas diferentes y GenoType se presenta en diferentes formatos: GenoType *Mycobacterium* CM para la identificación de 14 de las especies de micobacterias de más interés clínico; GenoType *Mycobacterium* AS para la identificación de 16 especies micobacterianas adicionales, y GenoType MTBC para identificar especies dentro del complejo *M. tuberculosis*

(*M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. bovis* ssp. *bovis*, *M. bovis* ssp. *caprae*, *M. microti*, y *M. tuberculosis* / *M. canettii*)^{25,26}.

Polymorphism Restriction Amplification (PRA)

Consiste en la amplificación mediante PCR del gen *hsp65*, seguida de una digestión del producto de amplificación mediante 2 enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*)^{27,28}. El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) permite diferenciar entre las diferentes especies micobacterianas. Los resultados se basan en el análisis de los patrones de restricción obtenidos en la electroforesis. La interpretación de los patrones se realiza de acuerdo con bases de datos internacionales (<http://app.chuv.ch/prasite/>). La utilización de un software para el análisis de las imágenes facilita la interpretación de los patrones de restricción.

PCR en tiempo real

Las técnicas de identificación mediante PCR en tiempo real, ya comentadas en el apartado de detección, se pueden emplear también para la identificación a partir de cultivo sólido o líquido²⁹.

Secuenciación

Las técnicas de secuenciación se pueden emplear para la identificación a partir de cultivo líquido o sólido. Las secuencias más empleadas para la identificación son 16S rADN y *hsp65*. Las secuencias obtenidas pueden analizarse en diversas bases de datos internacionales. Estas técnicas son laboriosas y requieren de un equipamiento que no siempre se encuentra disponible en los laboratorios de microbiología.

Detección de los mecanismos de resistencia

La mayoría de las técnicas moleculares desarrolladas se han dirigido a detectar mutaciones relacionadas con la resistencia a la rifampicina (RIF) y la isoniazida (INH). La resistencia a la RIF está relacionada con mutaciones en la región de 81 bp del gen *rpoB* (codones 507-533) que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa dependiente del ADN³⁰. En más del 95% de las cepas resistentes, las mutaciones se encuentran en esta zona concreta, lo cual ha facilitado el desarrollo de métodos para su detección. Sin embargo, las bases moleculares de la resistencia a INH son más complejas, ya que las mutaciones involucradas se encuentran en más de un gen o complejos genómicos como *katG*, *inhA*, *KasA* y la región intergénica del complejo *oxyR-aphC*³¹. El gen *KatG* codifica la enzima catalasa-peroxidasa, encargada de la activación de la INH. La mutación más frecuente se encuentra en el codón 315 y se asocia a nivel de resistencia alto (> 1 $\mu\text{g/ml}$)^{31,32}. Por su parte, el gen *inhA* codifica para la enzima enoíl ACP reductasa que participa en el proceso de síntesis de los ácidos micólicos de la pared bacteriana. Las mutaciones en la región reguladora se traducen en un aumento de la síntesis de la enzima, compensando la acción inhibitoria de la INH. Por eso, las mutaciones asociadas a este gen suelen conferir resistencia a INH de bajo nivel (< 1 $\mu\text{g/ml}$)^{31,33}.

Actualmente hay distintas técnicas moleculares para detectar resistencias de *M. tuberculosis*. Se basan en la

amplificación de la región genómica de interés, es decir, aquella en la que se han descrito mutaciones asociadas a la aparición de resistencia a alguno de los fármacos y el posterior análisis del producto amplificado. En función del sistema de revelado, los métodos moleculares se dividen en 4 categorías: electroforesis, hibridación, PCR en tiempo real y secuenciación.

Revelado por electroforesis

Estas técnicas se basan en el estudio de los patrones de movilidad electroforética que tienen los fragmentos de ADN, en función de si son secuencias *wild type* o si presentan mutaciones. Para facilitar la detección de los cambios en la estructura terciaria del ADN, se seleccionan diferentes condiciones electroforéticas y se usan geles de poli-acrilamida de alta resolución. Hay 2 variantes ampliamente estudiadas, como son la PCR-SSCP (*single-strand-conformation-polymorphisms*) y la técnica de *heteroduplex*³⁴. Son técnicas rápidas y fáciles de realizar, aunque no todos los cambios nucleotídicos son fáciles de detectar.

Revelado por hibridación en fase sólida

Hay 2 sistemas comercializados: INNO-Lipa Rif Tb³⁵, que detecta resistencia a RIF, e y GenoType MTBDR-plus³⁶, que detecta resistencia a RIF e INH. Ambos ensayos se basan en el uso de unas membranas de nitrocelulosa sobre las cuales están fijadas unas sondas para secuencias de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA*, que son capaces de identificar individualmente las mutaciones de interés.

Estas técnicas tienen una buena sensibilidad analítica cuando se utilizan a partir de cepas aisladas, que se correlacionan con los resultados fenotípicos de los antibiogramas convencionales y de secuenciación. De todos modos, la sensibilidad de las técnicas también depende de la frecuencia con que las mutaciones estudiadas se presenten en el ámbito epidemiológico de estudio. También se han usado para la detección de resistencia directamente en muestras clínicas. Para las muestras con baciloscopia positiva, los valores de sensibilidad obtenidos son elevados, mientras que para las muestras con baciloscopia negativa estas técnicas no poseen suficiente sensibilidad.

Una variante también basada en el principio de hibridación son los *arrays* de ADN. En este caso, las sondas se encuentran inmovilizadas en un soporte de sílice o vidrio. Una de las ventajas es que permite incorporar un número mayor de sondas, con lo que así aumenta su capacidad de detección. Tiene una buena sensibilidad en cepa y muestra directa positiva³⁷.

Revelado por PCR en tiempo real

Estas técnicas se han implementado recientemente para detectar las mutaciones causantes de resistencia a RIF e INH, a partir de cepa y también de muestra directa, con resultados prometedores^{38,39}.

Revelado por secuenciación

Es el método de referencia, ya que permite detectar directamente todas las mutaciones que sean predictivas de resistencia. Se trata de una tecnología más compleja que las detalladas anteriormente, aunque la automatización ha permitido el desarrollo de múltiples y variadas aplica-

TABLA 2. Ventajas y limitaciones de las principales técnicas de tipificación molecular

	Ventajas	Limitaciones
IS6110 RFLP	Los patrones pueden ser informatizados Reloj biológico Alta diversidad en aislados > 6 IS6110 Las membranas se pueden rehibridar con otras sondas Detecta infecciones mixtas Epidemiología molecular, evolución y filogenia, contaminaciones en el laboratorio	Requiere subcultivos y extracción de ADN Laborioso No útil en aislados < 6 copias de IS6110 o sin IS6110 Difícil para realizar comparaciones interlaboratorios
Spoligotyping	Técnica sencilla Permite comparaciones intralaboratorios e interlaboratorios Permite la realización en lisados y bacterias no viables Bases de datos disponibles Ideal para un cribado de los aislados Epidemiología molecular, contaminaciones en el laboratorio	Menor poder diferenciador que IS6110RFLP o MIRU-VNTR No detecta infecciones mixtas Menos informativa en regiones con cepas predominantes o endémicas
MIRU-VNTR (12 locus)	Rápida y con alto rendimiento Resultados digitalizados, fáciles de comparar Útil para genotipar muchas cepas Permite la realización en lisados Análisis manual o automático Detecta infecciones mixtas Aplicación en epidemiología molecular	Menor poder diferenciador que IS6110RFLP Patrones similares en linajes diferentes Reloj biológico de 12 locus, muy lento para el estudio de cepas endémicas
MIRU-VNTR (15 locus)	Igual que para 12 locus pero con mayor resolución Comparable con IS6110 Aplicación en epidemiología molecular	Igual que para 12 locus (faltan más estudios)

ciones. Por ahora, sólo se han obteniendo buenos resultados en la detección de mutaciones en los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* cuando se ha empleado a partir de cepa.

Epidemiología molecular

Las técnicas de epidemiología molecular permiten estudiar la clonalidad de las cepas de *M. tuberculosis*. De esta forma podemos estudiar brotes de TB, la dinámica de transmisión de esta enfermedad, casos de TB recurrente y contaminaciones cruzadas en el laboratorio⁴⁰. A continuación se detallan las técnicas utilizadas en los estudios de epidemiología molecular cuyas ventajas, limitaciones y aplicaciones se resumen en la tabla 2.

Análisis por RFLP del IS6110

Es la técnica de referencia en el estudio de la clonalidad de las cepas de *M. tuberculosis*⁴¹. La IS6110 es una secuencia de inserción única del complejo *M. tuberculosis* y la variabilidad, tanto en el número de copias, como en la localización en el cromosoma, genera un elevado polimorfismo entre cepas de diferentes orígenes. Esta técnica permite estudiar el número de copias y la distribución de IS6110 a lo largo del genoma (fig. 1). Consiste en una digestión del genoma de la micobacteria con la enzima *PvuII*, una electroforesis, transferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior hibridación y detección con una sonda (IS6110) marcada. Es una técnica con un gran poder de diferenciación y reproducibilidad. Sin embargo, es muy laboriosa (3-4 días de trabajo), requiere mucha cantidad de ADN y, aunque hay bases de datos de los patrones de las

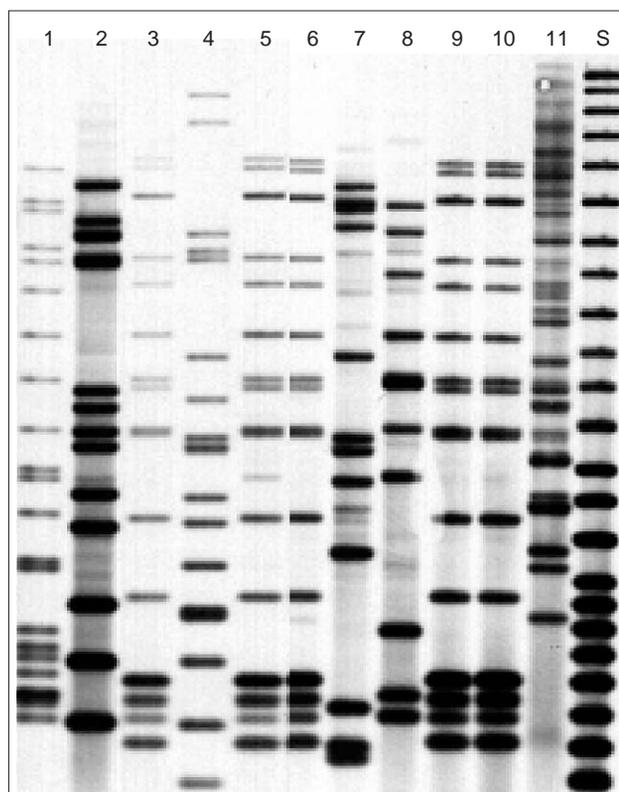


Figura 1. Técnica de análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción en la que se estudian los patrones de restricción de 11 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas 3, 5, 6, 9 y 10 comparten un mismo patrón de bandas.

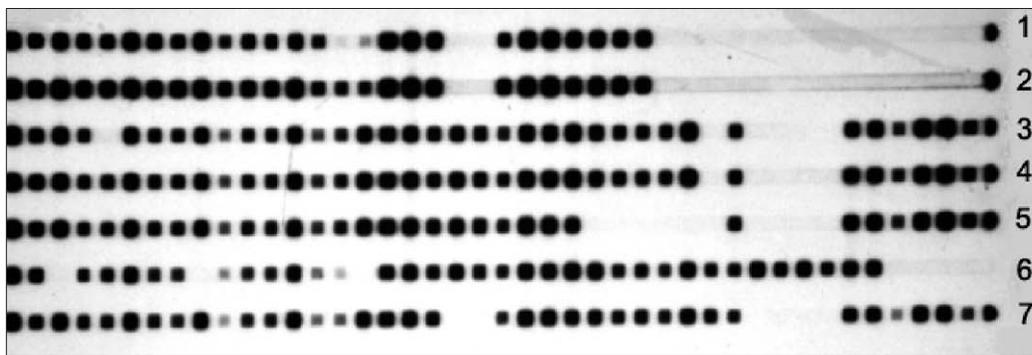


Figura 2. Spoligotyping. Las 2 últimas filas corresponden a las cepas *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (7) y *Mycobacterium bovis*-BCG (6). Las filas 1-6 corresponden a diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

diferentes cepas aisladas en todo el mundo, puede ser difícil comparar los resultados entre laboratorios.

Spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)

Las secuencias DR (*direct repeat*) son secuencias repetidas de 36 pb que se encuentran en un único locus del cromosoma del complejo *M. tuberculosis*, separadas por secuencias de 34 a 41 pb. La técnica consiste en la amplificación de los locus donde se encuentran las secuencias DR. Este producto se hibrida con oligonucleótidos sintetizados de espacios inter-DR. La ausencia o presencia de los diferentes DR permite obtener un patrón específico para cada cepa⁴². El spoligotyping es menos laborioso, requiere trabajar con una menor cantidad inicial de ADN, y es de fácil interpretación, cuyos resultados son comparables entre laboratorios (fig. 2). Sin embargo, tiene un menor poder diferenciador que la RFLP o MIRU-VNTR. Dada su simplicidad y rapidez, puede considerarse una técnica útil como método de cribado. También puede emplearse como segunda técnica en cepas con escasas copias de IS6110.

Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit – Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR)

El MIRU-VNTR clásico analiza 12 locus diferentes (MIRU-12) de unas secuencias genéticas denominadas *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs)⁴³. Las repeticiones de estas secuencias se detectan por PCR *multiplex* mediante primers complementarios a las regiones adyacentes a las secuencias repetitivas. El producto amplificado de cada cepa a estudiar se somete a electroforesis o a secuenciación, y se estima el tamaño de los fragmentos amplificados y el número de unidades repetidas en cada locus. De manera que se obtiene un código numérico para cada cepa que corresponde al número de repeticiones en los diferentes locus. A pesar de que se considera que tiene un elevado poder de diferenciación, en los últimos años se han descrito ciertas limitaciones y discrepancias con la RFLP, lo que ha supuesto que se analicen 15 locus (MIRU-15), en lugar de sólo 12 para aumentar su poder diferenciador⁴⁴. Las técnicas del MIRU-VNTR son laboriosas y están aún poco estandarizadas.

Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism method (FAFLP)

Es una técnica que combina una restricción del ADN micobacteriano con enzimas específicas (*EcoRI* y *MseI* o *BamHI* y *MspI*), seguida de una amplificación con oligonucleótidos fluorescentes de IS6110 y revelado del número

de fragmentos y tamaño de los mismos o bien en análisis de gel de poliacrilamida o mediante secuenciación. Esta técnica se ha mostrado especialmente útil en las cepas con pocas copias del IS6110 y, aunque ha sido poco evaluada, los resultados la muestran como una técnica con un elevado poder diferenciador, similar a IS6110 RFLP⁴⁵⁻⁴⁷.

Pirosecuenciación

La pirosecuenciación⁴⁸ es una técnica semiautomatizada de secuenciación que se basa en la detección cuantitativa del pirofosfato que se libera al incorporarse un nucleótido durante la síntesis de ADN. El pirofosfato producido entra en una cascada enzimática, donde una sulfurilasa lo utiliza para sintetizar trifosfato de adenosina, lo que permite a la luciferasa producir luz al metabolizar la luciferina a oxiluciferina. La luz emitida, que es proporcional al número de nucleótidos que se incorporan, se representa en forma de pirogramas (fig. 3). Este método es óptimo para la secuenciación de secuencias cortas (20-30 bases de ADN). Esta tecnología, que se basa en el polimorfismo de un único nucleótido, se ha utilizado para identificar, detectar resistencias a los antibióticos y tipificar numerosos microorganismos. Hay algunos estudios que demuestran la utilidad de la pirosecuenciación para identificar diferentes especies de micobacterias⁴⁹ y la detección de resistencia a RIF, INH, etambutol y fluoroquinolonas, tanto a partir de cepas de *M. tuberculosis*, como de muestras clínicas directas (fig. 4)⁴⁹⁻⁵¹.

La pirosecuenciación puede ser una alternativa real a las técnicas actuales, que nos permita detectar la presencia de micobacterias, identificarlas y detectar en *M. tuberculosis* las mutaciones más frecuentemente asociadas a resistencia a los fármacos antituberculosos, a partir de muestra directa. La pirosecuenciación puede ayudarnos a reducir los retrasos diagnósticos y a mejorar en el manejo y tratamiento de las TB multirresistentes.

Conclusiones

Las técnicas moleculares para la detección directa de *M. tuberculosis* en muestra clínica se han mostrado de gran ayuda en el diagnóstico de la TB, y hay reactivos aprobados por diversos organismos internacionales; sin

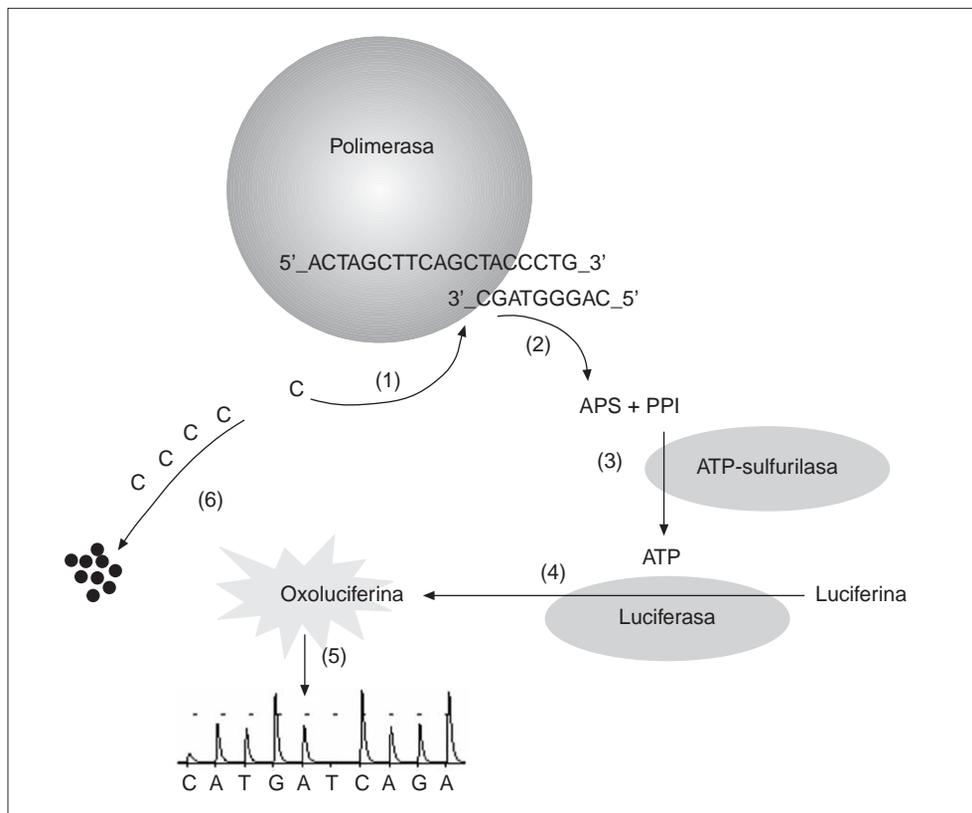


Figura 3. Esquema del fundamento de la pirosecuenciación. ATP: trifosfato de adenosina. APS: fosfosulfato de adenosina; PPI: pirofosfato.

embargo, aún presentan algunas limitaciones, entre ellas una sensibilidad baja en muestras paucibacilares y en muestras extrarrespiratorias. Esto implica que los resultados deben interpretarse con cierta cautela y que estas técnicas no pueden todavía sustituir completamente a los métodos convencionales. En estos momentos, la evalua-

ción previa del grado de riesgo clínico de TB es de gran importancia en los valores predictivos de las técnicas. De forma que, en pacientes con sospecha alta de TB o con baciloscopia positiva, un resultado positivo tiene un elevado valor predictivo positivo, y un resultado negativo, sin embargo, no excluye el diagnóstico de TB. Por el contra-

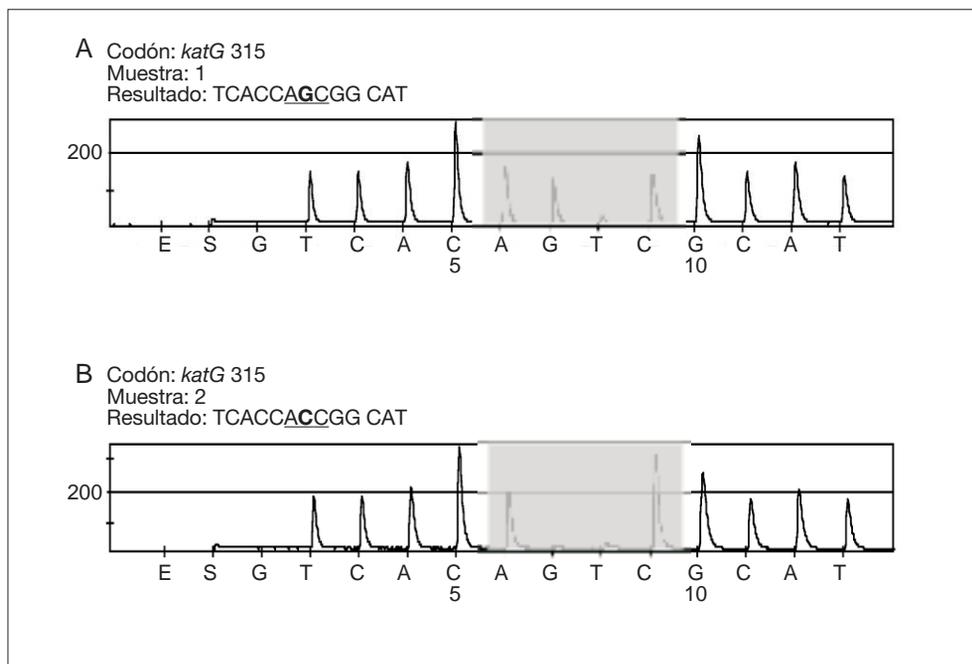


Figura 4. A, pirograma de una cepa *wild type* para el codón *katG* Ser315. El codón se muestra subrayado en la secuencia y sombreado en el pirograma. B, pirograma de una cepa con una mutación en el codón *katG* Ser315 (AGC → ACC) que le confiere resistencia a la isoniacida. El nucleótido afectado por la mutación se marca en negrita en la secuencia y sombreado en el pirograma.

rio, en pacientes con una sospecha baja de TB y baciloscopia negativa, un resultado positivo tiene un valor diagnóstico escaso y un resultado negativo prácticamente excluye el diagnóstico de TB. Por el contrario, las técnicas moleculares para identificar las micobacterias se encuentran actualmente perfectamente estandarizadas y son ampliamente empleadas por la mayoría de laboratorios.

Por lo que respecta a las técnicas moleculares de detección de resistencias, se ha de tener en cuenta que únicamente se incluyen las mutaciones más frecuentes relacionadas con resistencia, principalmente a RIF e INH. Por lo que la identificación de una mutación mediante una técnica molecular es clínicamente informativa, mientras que la ausencia de mutación en la secuencia analizada debe interpretarse con cautela. También hay la posibilidad de que podamos estar detectando mutaciones que no se relacionen con una resistencia fenotípica. Además, no se conoce bien cuál es la proporción de bacilos resistentes, detectables por técnicas moleculares, que se traduce en resistencia clínica.

Las técnicas de epidemiología molecular convencionales son extraordinariamente robustas y continuarán siendo consideradas de referencia en el futuro. Sin embargo, serán necesarias nuevas técnicas que sean más reproducibles, con un alto grado de diferenciación, preferiblemente automatizadas, y basadas en técnicas basadas en PCR, que nos permitan establecer de forma más rápida la clonalidad de las cepas y que puedan implementarse de forma amplia en los laboratorios de microbiología.

En este momento, a pesar de las limitaciones que hemos comentado, disponemos de técnicas que nos permiten reducir el tiempo de diagnóstico, con la detección de la presencia de *M. tuberculosis* en muestra directa y la identificación, también en muestra directa, de las mutaciones que codifican para resistencia a los principales antituberculosos. No cabe duda que el futuro del diagnóstico, el tratamiento y el control de la TB pasará por la universalización del uso de nuevas técnicas moleculares.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. DeAngelis CD, Flanagan A. Tuberculosis - a global problem requiring a global solution. *JAMA*. 2005;293:2793-4.
2. CIDA. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1376-95.
3. Flores LL, Pai M, Colford JM Jr, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol*. 2005;5:55.
4. Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, Manterola JM, Lonca J, Cardona PJ, et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 1998;36:684-9.
5. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, et al. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4138-42.
6. Visca P, De Mori P, Festa A, Montrone ML, Amicosante M, Pucillo LP. Evaluation of the BDProbeTec strand displacement amplification assay in com-

- parison with the AMTD II direct test for rapid diagnosis of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:332-4.
7. Middleton AM, Cullinan P, Wilson R, Kerr JR, Chadwick MV. Interpreting the results of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *M. tuberculosis* rRNA. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2741-3.
8. Alcalá L, Ruiz-Serrano MJ, Hernangomez S, Marin M, Garcia de Viedma D, San Juan R, et al. Evaluation of the upgraded amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test (gen-probe) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;41:51-6.
9. Gamboa F, Domínguez J, Padilla E, Manterola JM, Gazapo E, Lonca J, et al. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1324-9.
10. Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L, et al. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1996-2002.
11. Padilla E, Manterola JM, Gonzalez V, Thornton CG, Quesada MD, Sanchez MD, et al. Comparison of the sodium hydroxide specimen processing method with the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method using independent specimens with auramine smear, the MB/BacT liquid culture system, and the COBAS AMPLICOR MTB test. *J Clin Microbiol*. 2005;43:6091-7.
12. Moon JW, Chang YS, Kim SK, Kim YS, Lee HM, Kim SK, et al. The clinical utility of polymerase chain reaction for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2005;41:660-6.
13. Goessens WH, De Man P, Koeleman JG, Luijckendijk A, Te Witt R, Endtz HP, et al. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2563-6.
14. Burggraf S, Reischl U, Malik N, Bollwein M, Naumann L, Olgemoller B. Comparison of an internally controlled, large-volume LightCycler assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples with the COBAS AMPLICOR assay. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1564-9.
15. Wang JY, Lee LN, Hsu HL, Hsueh PR, Luh KT. Performance assessment of the DR. MTBC Screen assay and the BD ProbeTec ET system for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44:716-9.
16. Wang JY, Lee LN, Chou CS, Huang CY, Wang SK, Lai HC, et al. Performance assessment of a nested-PCR assay (the RAPID BAP-MTB) and the BD ProbeTec ET system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4599-603.
17. McHugh TD, Pope CF, Ling CL, Patel S, Billington OJ, Gosling RD, et al. Prospective evaluation of BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of tuberculosis in non-respiratory and respiratory samples. *J Med Microbiol*. 2004;53:1215-9.
18. Perandin F, Pinsi G, Signorini C, Manca N. Evaluation of INNO-LiPA assay for direct detection of mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens. *New Microbiol*. 2006;29:133-8.
19. Franco-Alvarez de Luna F, Ruiz P, Gutierrez J, Casal M. Evaluation of the GenoType *Mycobacteria* Direct assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3025-7.
20. Hillemann D, Galle J, Vollmer E, Richter E. Real-time PCR assay for improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10:340-2.
21. Yam WC, Yuen KY, Kam SY, Yiu LS, Chan KS, Leung CC, et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *J Med Microbiol*. 2006;55:529-36.
22. Padilla E, Manterola JM, Rasmussen OF, Lonca J, Domínguez J, Matas L, et al. Evaluation of a fluorescence hybridisation assay using peptide nucleic acid probes for identification and differentiation of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in liquid cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19:140-5.
23. Trueba F, Fabre M, Saint-Blancard P. Rapid identification of *Mycobacterium genavense* with a new commercially available molecular test, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4403-4.
24. Padilla E, Gonzalez V, Manterola JM, Perez A, Quesada MD, Gordillo S, et al. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA *Mycobacteria* and genotype *Mycobacterium* assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3083-8.
25. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* Assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1769-75.
26. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Tselentis Y. Use of the GenoType *Mycobacterium* CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2244-6.

27. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:175-8.
28. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2799-806.
29. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:165-256.
30. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79:3-29.
31. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jaspere L, Pan X, Wanger A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1241-50.
32. Van Soolingen D, De Haas PE, Van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis.* 2000;182:1788-90.
33. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3659-64.
34. Telenti A, Honore N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol.* 1997;35:719-23.
35. Gamboa F, Cardona PJ, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Padilla E, et al. Evaluation of a commercial probe assay for detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* directly from respiratory and nonrespiratory clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17:189-92.
36. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2635-40.
37. Aragon LM, Navarro F, Heiser V, Garrigo M, Espanol M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:825-31.
38. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38: 3194-9.
39. Garcia de Viedma D, Del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcala L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:988-95.
40. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:658-85.
41. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31:406-9.
42. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35:907-14.
43. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Loch C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol.* 1997;26:991-1003.
44. Alonso-Rodriguez N, Martinez-Lirola M, Herranz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, Bouza E, et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol.* 2008;8:34.
45. Thorne N, Evans JT, Smith EG, Hawkey PM, Gharbia S, Arnold C. An IS6110-targeting fluorescent amplified fragment length polymorphism alternative to IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium tuberculosis* DNA fingerprinting. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:964-70.
46. Goulding JN, Stanley J, Saunders N, Arnold C. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1121-6.
47. Kassama Y, Shemko M, Shetty N, Fang Z, Macintyre G, Gant V, et al. An improved fluorescent amplified fragment length polymorphism method for typing *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:288-9.
48. Diggle MA, Clarke SC. Pyrosequencing: sequence typing at the speed of light. *Mol Biotechnol.* 2004;28:129-37.
49. Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:122-30.
50. Isola D, Pardini M, Varaine F, Niemann S, Rusch-Gerdes S, Fattorini L, et al. A Pyrosequencing assay for rapid recognition of SNPs in *Mycobacterium tuberculosis* embB306 region. *J Microbiol Methods.* 2005;62:113-20.
51. Zhao JR, Bai YJ, Zhang QH, Wang Y, Luo M, Yan XJ. Pyrosequencing-based approach for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51:135-7.