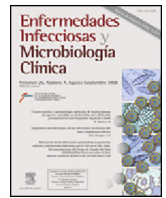




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Evaluación del panel gastrointestinal xTAG®-GPP de Luminex en el diagnóstico de las gastroenteritis agudas



Cristina Casañ, María Dolores Ocete*, Rafael Medina y Concepción Gimeno

Área Clínica de Microbiología, Enfermedades Infecciosas y Medicina Preventiva, Servicio de Microbiología, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de octubre de 2015

Aceptado el 23 de febrero de 2016

On-line el 6 de abril de 2016

Palabras clave:

Diagnóstico molecular

Panel gastrointestinal Luminex

Infección gastrointestinal

R E S U M E N

Introducción: La mayoría de laboratorios de microbiología utilizan diferentes técnicas para el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales. Algunas requieren hasta 72 h para obtener resultados definitivos.

Material y métodos: El panel gastrointestinal de Luminex (xTAG-GPP, Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canadá) se trata de un ensayo cualitativo multiplex rápido y sensible capaz de detectar e identificar simultáneamente los 15 patógenos más frecuentes causantes de gastroenteritis. Nuestro objetivo ha sido evaluar este panel multiplex comparándolo con los métodos habituales empleados en nuestro laboratorio.

Resultados: Se analizaron 225 muestras de heces. A través de los métodos convencionales fueron 74 las muestras positivas (32,9%). A través de Luminex fueron 137 las muestras positivas (60,9%).

Conclusión: El uso del panel gastrointestinal de Luminex puede mejorar el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales principalmente porque proporciona resultados en menos de 8 h. Determinados microorganismos deben interpretarse con precaución y basándose en datos clínicos y epidemiológicos del paciente.

© 2016 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Evaluation of the Luminex xTAG®-GPP (Gastrointestinal Pathogen Panel) in the diagnosis of diseases with acute diarrhoea

A B S T R A C T

Introduction: Most Microbiology laboratories use different techniques for the diagnosis of gastrointestinal infections. Some of which require at least 72 hours to obtain final results.

Material and Methods: The gastrointestinal panel Luminex (xTAG-GPP, Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canada) is a qualitative multiplex fast and sensitive assay able to detect and to identify the 15 most common pathogens causing gastrointestinal infection simultaneously. We evaluated this multiplex panel comparing it with conventional methods used in our laboratory.

Results: We analyzed 225 samples of feces. Through the conventional methods were positive 74 samples (32.9%). Through the Luminex method were positive 137 samples (60.9%).

Conclusions: The use of the xTAG® GPP system in Clinical Microbiology can improve the diagnosis of gastrointestinal infectious because it provides results in less than 8 hours. Some pathogens should be applied with caution and should be interpreted based on the patient's clinical data.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

Molecular diagnosis

Gastrointestinal panel Luminex

Gastrointestinal infection

Introducción

Las infecciones gastrointestinales causan una elevada morbilidad en nuestro medio. Un amplio espectro de microorganismos pueden ser los responsables y presentar las mismas

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ocete_mar@gva.es (M.D. Ocete).

manifestaciones clínicas. Por tanto, la identificación del agente etiológico es importante para su diagnóstico y tratamiento. La mayoría de laboratorios de Microbiología utilizan diferentes técnicas para su diagnóstico y algunas, como es el cultivo, necesitan hasta 72 h para obtener resultados definitivos. Como alternativa, ciertos laboratorios disponen de métodos moleculares que son utilizados en situaciones concretas, pero estos detectan un número limitado de microorganismos en un mismo análisis.

El Panel Gastrointestinal xTAG-GPP se trata de un ensayo multiplex cualitativo de PCR capaz de detectar e identificar de forma simultánea, y en menos de 8 h, los 15 patógenos más comunes causantes de gastroenteritis. Los patógenos incluidos son: a) 3 virus: Adenovirus 40/41, Rotavirus A, Norovirus GI/GII; b) 9 bacterias: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O 157 y toxinas como la toxina A/B de *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC): enterotoxina lábil (LT)/enterotoxina termoestable (ST), *Escherichia coli* O 157, *E. coli* (STEC) productor de toxina shiga (stx1/stx2), y c) 3 parásitos: *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.

Nuestro principal objetivo ha sido comparar los resultados obtenidos a través de los métodos convencionales de diagnóstico utilizados en nuestro laboratorio con los resultados obtenidos mediante el panel molecular de Luminex.

Material y métodos

Se analizaron 225 muestras de heces frescas remitidas en envase estéril de tapón de rosca, de pacientes con diarrea aguda y de cualquier edad. Las muestras se enviaron al Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia durante el mes de julio y hasta noviembre de 2013, siguiendo las normas de envío y conservación adecuadas.

Inicialmente, las muestras fueron procesadas de forma rutinaria. El cultivo se utilizó para la detección de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. Para ello se utilizaron medios poco selectivos, como el agar MacConkey y el agar sangre, medios de cultivo con selectividad media como el agar Hecktoen y medios líquidos de enriquecimiento como el caldo de selenito. Todos ellos se incubaron 24 h a 37 °C, excepto el caldo selenito, que se incubó 48 h. Para el aislamiento de *Campylobacter* spp. se utilizó un medio selectivo y se incubó 48 h en atmósfera microaerófila a una temperatura de 42 °C. Para la identificación, las colonias sospechosas se analizaron a través

del sistema MALDI-TOF, y para el estudio de sensibilidad se utilizó el panel NC69 de MicroScan (Siemens). *Clostridium difficile* toxigénico se detectó por enzimoimmunoanálisis (*C. difficile* Quik Chek Complete, Alere). Este test detecta el antígeno glutamato deshidrogenasa y las toxinas A/B directamente de las muestras de heces. Los resultados toxina A/B positivos se confirmaron mediante PCR, tal y como indican los protocolos. Para la detección de Adenovirus y Rotavirus se utilizó un test rápido de detección de antígenos en heces (inmuncromatografía, Rota-Adeno Letitest). En nuestro hospital no se estudia de forma rutinaria Norovirus. La presencia de parásitos se realizó mediante técnicas microscópicas.

Inmediatamente después de su procesamiento habitual, las heces se almacenaron a –80 °C hasta su posterior análisis mediante el sistema Luminex. Esta técnica incluye varios pasos: pretratamiento de la muestra, extracción del ácido nucleico, RT-PCR múltiple, reacción de hibridación con microesferas y fase de detección e interpretación mediante el instrumento Luminex (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canadá) a través del programa TDAS GPP 1.11 software.

Resultados

Se analizaron 225 muestras de heces, y en 144 (64%) se detectaron uno o más patógenos (tabla 1). Las muestras positivas coincidentes en resultados por ambos métodos fueron 67/225 (29,7%). Rotavirus A fue el patógeno más frecuente.

Por el método Luminex, las muestras positivas fueron 137/225 (60,9%), pero las positivas únicamente por este método fueron 70 de 225 (31,1%). Los patógenos «extra» detectados fueron: Norovirus (n=34), Adenovirus y Rotavirus (n=3), *Salmonella* spp. (n=31), seguido de *C. difficile* toxigénico (n=19) y *Campylobacter* spp. (n=16). *Shigella* spp estuvo presente en 5 muestras y *Yersinia* spp., en una. Cuatro muestras fueron positivas para STEC y una para *E. coli* serotipo O 157. *Vibrio cholerae*, ETEC y *E. histolytica* no se encontraron en ninguna muestra. *Cryptosporidium* spp. y *Giardia lamblia* estuvieron presentes en 3 y 6 muestras, respectivamente.

Por medio de los métodos convencionales fueron positivas 74/225 (32,9%), pero únicamente fueron 7 las muestras positivas por este método exclusivamente (3,1%). Los microorganismos implicados fueron: Rotavirus A (n=3), *Salmonella* spp. (n=2), *Campylobacter* spp. y *C. difficile* toxigénico (n=1).

En 45 muestras (20%) se detectó más de un patógeno mediante Luminex. Los microorganismos y combinaciones halladas se detallan en la tabla 2.

Tabla 1

Patógenos detectados según el método empleado (n = 144)

Patógeno	Solo mediante xTAG-GPP (n = 70)	Solo mediante métodos convencionales (n = 7)	Ambos métodos (n = 67)	Total
Adenovirus 40/41	3	0	5	8
Norovirus GI/GII	34	–	–	34
Rotavirus A	3	3	35	41
<i>Clostridium difficile</i> Toxina A/B	19	1	4	24
<i>Campylobacter</i> spp.	16	1	12	29
ETEC ST/LT	0	–	–	0
STEC stx1/stx2	4	–	–	4
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1	–	–	1
<i>Salmonella</i> spp.	31	2	11	44
<i>Shigella</i> spp.	5	0	0	5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0	1
<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	0	0
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	0	0	3
<i>Entamoeba histolytica</i>	0	0	0	0
<i>Giardia lamblia</i>	6	0	0	6
Total	126	7	67	200

Tabla 2
Combinaciones detectadas (n = 45)

Microorganismo 1	Microorganismo 2	Otros	Número de muestras
Rotavirus ^a	Norovirus		4
Rotavirus ^a	<i>Salmonella</i>		3
Rotavirus ^a	Adenovirus		1
<i>Campylobacter</i> ^a	<i>Giardia</i>	Toxina A/B	1
<i>Campylobacter</i>	Norovirus		2
<i>Campylobacter</i>	Toxina A/B		2
Rotavirus ^a	<i>Campylobacter</i>		2
<i>Giardia</i>	Norovirus		1
Adenovirus ^a	Rotavirus		1
<i>Shigella</i>	Norovirus	<i>Campylobacter</i> , Rotavirus	1
Norovirus	Toxina		4
Adenovirus	Norovirus		1
Rotavirus ^a	Norovirus	Toxina	1
<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>		2
Rotavirus ^a	STEC	<i>Salmonella</i>	1
Norovirus	<i>Salmonella</i>		4
<i>Salmonella</i>	STEC	Toxina	1
Toxina	<i>Salmonella</i>		1
<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>		1
Rotavirus ^a	Toxina		3
<i>Campylobacter</i>	Norovirus	<i>Salmonella</i>	1
<i>Shigella</i>	Norovirus		1
Rotavirus ^a	Adenovirus ^a	Norovirus	1
<i>Salmonella</i>	Rotavirus	Norovirus	1
<i>Salmonella</i>	<i>Giardia</i>		1
Norovirus	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Salmonella</i> , Toxina	1
<i>Salmonella</i>	<i>Cryptosporidium</i>		1
Rotavirus ^a	Toxina	Norovirus	1
Total			45

^a Microorganismos detectados por ambos métodos.

Discusión

El panel de Luminex presenta diversas ventajas con respecto a los métodos convencionales. La más resaltada es la detección simultánea de múltiples patógenos y la disminución del tiempo de diagnóstico a 6–8 h^{1–6}. Además, permite la detección de microorganismos de los cuales no disponemos métodos de diagnóstico rutinario, y de infecciones mixtas.

En este estudio, en total se detectaron 126 patógenos «extras»: *Salmonella* spp. y Norovirus fueron los mayoritarios, seguidos de la toxina de *Clostridium difficile* y *Campylobacter* spp. En el caso de *Salmonella*, en nuestro medio es muy importante un diagnóstico preciso. Su alta e inesperada detección mediante el panel de Luminex también ha sido destacada en otros artículos^{1–3,7}. La misma situación se describe con *E. histolytica* en regiones donde este parásito es muy prevalente^{1,7,8}. En nuestro estudio, sin embargo, no se detectó en ninguna muestra.

En la detección de *C. difficile*, el 69,5% (16/23) pertenecieron a muestras de heces de niños menores de 5 años. Es decir, se detectó en un grupo de población donde el test rápido no había sido solicitado por el clínico. En la población pediátrica continúa siendo un tema en debate debido a la alta posibilidad de portadores asintomáticos. Aun así, como indican Khare et al.⁹, la alta detección de la toxina de *C. difficile* en niños representa una importante área de estudio.

Norovirus también fue detectado en gran número de muestras (n = 34). Muchos laboratorios no estudian este virus de forma rutinaria debido a la escasa sensibilidad de los métodos de EIA, por lo que se sospecha que es el causante de gran parte de los casos sin diagnosticar. En este trabajo no se realizó la detección de antígeno, y por tanto carecemos de los datos para poder compararlos. No obstante, resultados inesperados, tanto de Norovirus como de *Campylobacter*, han sido descritos por otros autores^{3,4}.

En nuestro estudio, la detección de Rotavirus mediante Luminex, al compararlos con los métodos inmunológicos de detección de antígeno, observamos que en el 85% (35/41) de los casos los resultados fueron coincidentes.

Patógenos menos frecuentes, como *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *STEC*, *Cryptosporidium* spp. y *Giardia lamblia*, Luminex los detectó en diferentes muestras, a diferencia de los métodos habituales. Nosotros no disponemos de resultados con un segundo método molecular, por lo que no podemos descartar la posibilidad de falsos positivos. En publicaciones de otros autores, como Beckmann et al.⁴, la mitad de los casos en los que se detectó *Giardia lamblia* no se confirmaron. En el caso de *Shigella* fueron 5 los pacientes implicados, y sí los comprobamos con una PCR simple. Se confirmaron 2 casos, de los cuales tuvimos acceso a la historia clínica, y ambos habían viajado recientemente a la India.

En una minoría de muestras (n = 7), las discrepancias se debieron a que fueron positivas por los métodos de rutina pero negativas por Luminex. Una posible causa sería la degradación de los ácidos nucleicos pese a la conservación óptima de la muestra a –80 °C.

Las infecciones mixtas no son frecuentes. En este estudio se detectó más de un patógeno en 45 muestras (20%). Las combinaciones cambian de unos estudios a otros^{2,4,9–12}, probablemente porque varían el área geográfica y tipo de población.

La alta sensibilidad de la técnica y la amplia detección de microorganismos en un mismo análisis proporcionan mucha información, a veces difícil de interpretar. Algunos estudios han indicado la necesidad de cuantificar los enteropatógenos, sobre todo en infecciones mixtas, y diferenciar entre patógenos con replicación activa o colonizadores para poder conocer la implicación de cada uno de ellos¹², ya que se sabe que determinados microorganismos pueden estar presentes en pacientes asintomáticos o un largo periodo de tiempo después tras la resolución de la infección.

Con respecto a otros paneles moleculares comercializados y aprobados para su uso en clínica¹³, Luminex presenta un alto rendimiento porque tiene capacidad para analizar hasta 24 muestras en un único panel, además de ser de los paneles con más número de patógenos detectados por análisis. Pero es una técnica laboriosa y compleja que para su manejo requiere personal cualificado y con experiencia en técnicas de biología molecular. Por otro lado, existe un alto riesgo de contaminaciones, al tratarse de un sistema abierto. Y es imprescindible un mantenimiento y una limpieza meticulosos diarios, tanto del instrumento como del lugar de trabajo. Todo esto dificulta su implantación como método rutinario en la mayoría de laboratorios de Microbiología, además de que no reemplazaría al cultivo, ya que en el caso de muestras positivas sería necesaria su confirmación o disponer de la cepa para estudios de sensibilidad. Por último, cabe mencionar su coste más elevado con respecto a otros métodos. Para obtener una relación coste/beneficio óptima es necesario analizar un número muy elevado de muestras, y esto no es factible en muchos laboratorios. No obstante, sería necesario realizar un estudio en profundidad con tales fines.

Como conclusión, el panel multiplex gastrointestinal de Luminex proporciona grandes ventajas en el diagnóstico de la gastroenteritis aguda por ser rápido e identificar en un mismo análisis los patógenos causantes del 80% de los casos de gastroenteritis infecciosa. Resultados positivos para determinados patógenos deben ser interpretados con precaución y dentro del contexto clínico del paciente. Nosotros recomendamos su uso principalmente en brotes, en estudios epidemiológicos, en casos de diarrea del viajero y en pacientes graves con alta sospecha de patología infecciosa.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Luminex Molecular Diagnostic el haberles proporcionado el instrumento y los reactivos utilizados en este estudio.

Bibliografía

1. Wessels E, Rusman LG, Van Bussel MJAWM, Claas ECJ. Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG GPP) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2013;20:182–7.
2. Pankhurst L, Macfarlane-Smith L, Buchanan J, Anson L, Davies K, O'Connor L, et al. Can rapid integrated polymerase chain reaction-based diagnostics for gastrointestinal pathogens improve routine hospital infection control practice? A diagnostic study. *Health Technol Asses.* 2014;18:1–67.
3. Mengelle C, Mansuy JM, Prere MF, Grouteau E, Claudet I, Kamar N, et al. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:458–65.
4. Beckmann C, Heininger U, Marti H, Hirsch HH. Gastrointestinal pathogens detected by multiplex nucleic acid amplification testing in stools of pediatric patients and patients returning from the tropics. *Infection.* 2014;42:961–70./S----L.
5. Kahlau P, Malecki M, Schildgen V, Schulz C, Winterfeld I, Messler S, et al. Utility of two novel multiplexing assays for the detection of gastrointestinal pathogens – a first experience. *Springerplus.* 2013;2:106.
6. Liu Y, Xu Z, Zhang Q, Jin M, Yu J, Li J, et al. Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastrointestinal by a multiplexed Luminex-based assay. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2384–9.
7. Halligan E, Edgeworth J, Bisnauthsing K, Bible J, Cliff P, Aarons E, et al. Multiplex molecular testing for management of infectious gastroenteritis in a hospital setting: A comparative diagnostic and clinical utility study. *Clin Microbiol Infect.* 2013;20:460–7.
8. Navidad J, Griswold D, Gradus M, Bhattacharyya S. Evaluation of Luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3018–24.
9. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, et al. Multiplex detection of gastrointestinal pathogens: A comparative evaluation of two commercial panels using clinical stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2014;52, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01637-14>.
10. Patel A, Navidad J, Bhattacharyya S. Site-specific clinical evaluation of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3068.
11. Perry MD, Corden SA, Howe RA. Evaluation of Luminex® xTAG® Gastrointestinal Panel and the Sayvon Diagnostics Gastrointestinal Infection Panel for the detection of enteric pathogens in clinical samples. *J Med Microbiol.* 2014;63:1419–26./JMM.–L.
12. Gratz JL, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, Howlader A, et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-Luminex assay. *J Clin Microbiol.* 2012;50:98–103.
13. Binnicker MJ. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3723–8.