

METODOS DIAGNOSTICOS NUEVOS VERSUS LOS TRADICIONALES



Globedia.com

Ana Isabel Barnes
Dto de Farmacia-
Facultad de Ciencias Químicas
UNC

*“De aquí en adelante no tendremos más frente a nosotros a una cosa vaga e indeterminada, estamos en presencia de un parásito visible y tangible. Se desarrolla en el hombre y con cegar las fuentes de donde viene la infección, y una de ellas **es seguramente la expectoración**, la lucha antituberculosa será un hecho.” (R. Koch, 1882).*



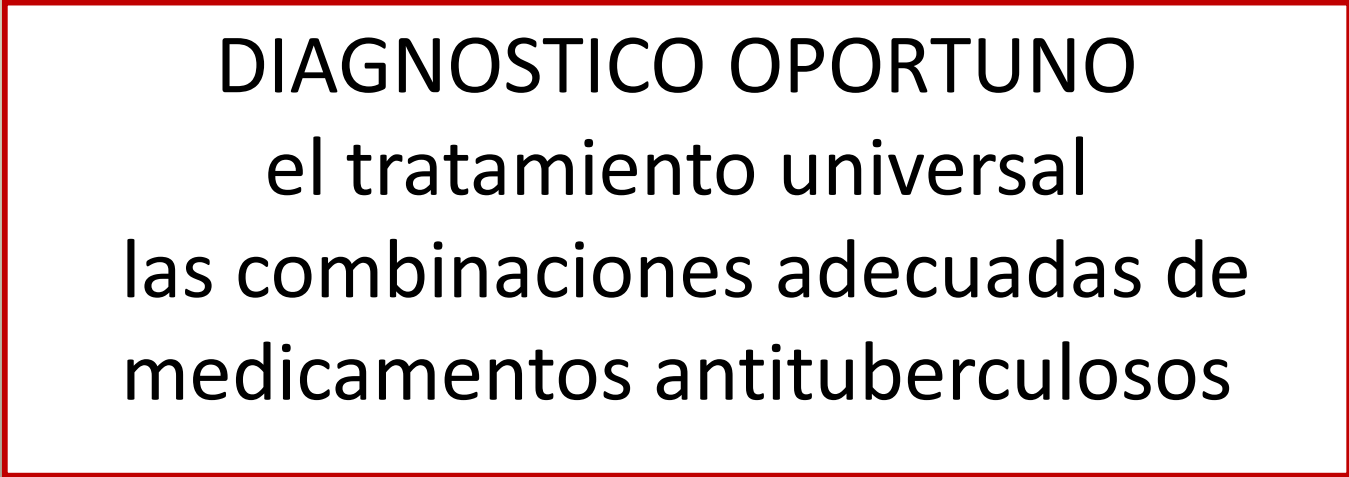
OMS



OPS



**ALTO A LA
TUBERCULOSIS**



DIAGNOSTICO OPORTUNO
el tratamiento universal
las combinaciones adecuadas de
medicamentos antituberculosos

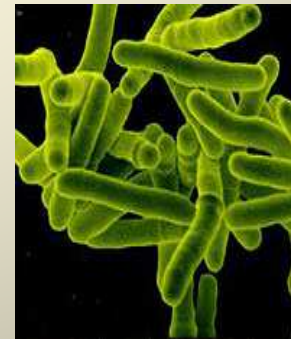
EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS



RELACION AL
PACIENTE



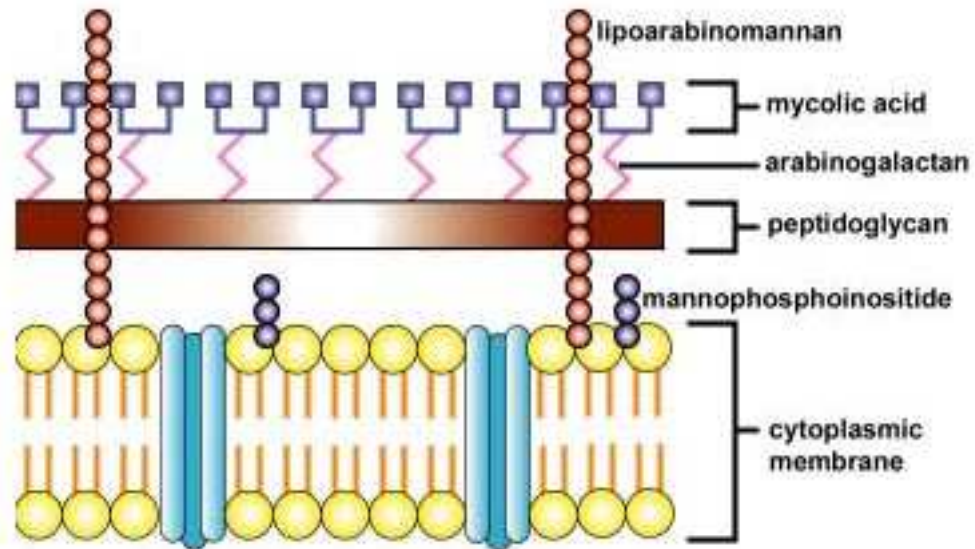
RELACION AL
BACILO





R. Koch.

CARACTERISTICAS DEL BACILO



from <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/u1fig11.html>

SR con BK reiteradamente negativa

Inmunosuprimidos

Pacientes con sospecha de tuberculosis extra pulmonar



Niños con sospecha clínica y epidemiológica de TB e imágenes radiológicas sospechosas

Antecedentes de tratamiento continúan con BK (+) al segundo mes del tratamiento

Descartar micobacteriosis o TB-MR.

**QUE RENDIMIENTO TIENEN LOS
DIFERENTES METODOS PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS
EXTRAPULMONAR?**

Pleural

Meníngea

Ganglionar

Pericárdica

METODOS UTILIZADOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULSOSIS

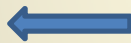
➤ CONVENCIONALES

➤ AUTOMATIZADOS

➤ BIOMOLECULARES

➤ OTROS

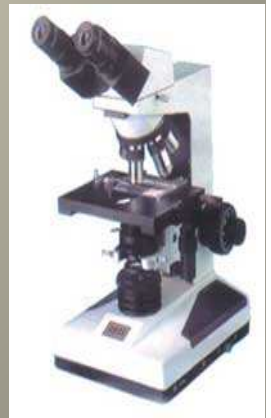
METODOS
RADIOMETRICOS Y NO
RADIOMETRICOS



METODOS CONVENCIONALES- BACILOSCOPIA



- *SIMPLE*
- *RAPIDA*
- *ECONOMICA*
- *ESPECIFICA*
- *MODERADA
SENSIBILIDAD*
- *PERO...*
- *POCO UTIL EN
MATERIALES
PAUCIBACILA-
RES.*



Microscopia de fluorescencia LED (light emitting diode)



LAMPARAS: vida media
LED: 20.000 hs vs lámparas
de mercurio/halógeno 1.000-
2.000 horas

NO requiere instalaciones especiales,
mantenimiento simple

Pacientes VIH-positivo, la microscopía con LED fue más sensible que el enfoque con ZN en las muestras sin concentrar (un 46 frente a un 39 por ciento) y más sensibles que el enfoque con FVM en las muestras concentradas (un 54 frente a un 46 por ciento), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

European Respiratory Journal, 9 de junio
del 2011

La OMS y la microscopía de fluorescencia LED para la detección de BAR

- **Introducir paulatinamente la microscopía de fluorescencia LED como sustitución de la microscopía óptica y la microscopía de fluorescencia convencional para la detección de BAR.**

6% más sensible

aumento de eficiencia

durabilidad,
No cuarto oscuro

“Fluorescent Light Emitting Diode (LED) Microscopy for Diagnosis of Tuberculosis”
(Microscopía fluorescente de diodos emisores de luz (LED) para la diagnosis de la tuberculosis. http://www.who.int/tb/laboratory/who_policy_led_microscopy_july10.pdf),

METODOS DIAGNOSTICOS CULTIVOS



Cultivo

- Identifican colonias 3-8 semanas:
 - Medios sólidos: Ogawa, Lowenstein-Jensen
- Identifican liberación de CO₂ en 10-15 días
 - BACTEC 460: radioactividad
 - MGIT 960: fluorescencia



SISTEMAS AUTOMATIZADOS

RADIOMETRICO



BACTEC 460

COLORIMETRICO



BACT/ALERT

FLUORIMETRICO



BACTEC 9000



BACTEC MGIT 960

BACT/ALERT



- *Utiliza medio de cultivo líquido a base de caldo Middlebrook enriquecido.*

- *Suplemento antibiótico.*

- *Detecta el dióxido de carbono producido por el metabolismo de las micobacterias por reflectancia.*

VENTAJAS

✓ *Mayor celeridad en el diagnóstico*

✓ *Mayor sensibilidad de recuperación*

✓ *Pruebas de sensibilidad*

DESVENTAJAS

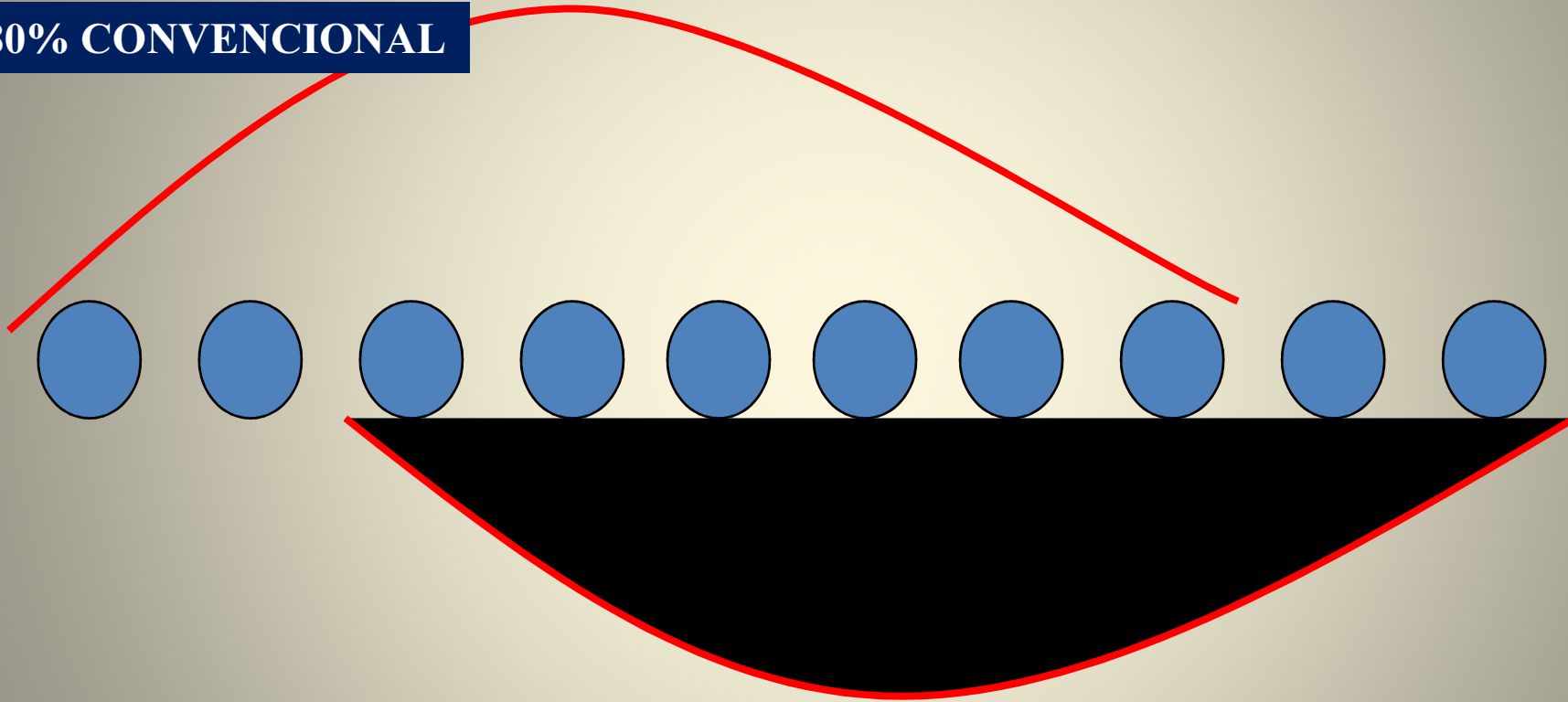
❖ *Mayor índice de contaminación*

❖ *Mayor carga de trabajo*

❖ *Costo*

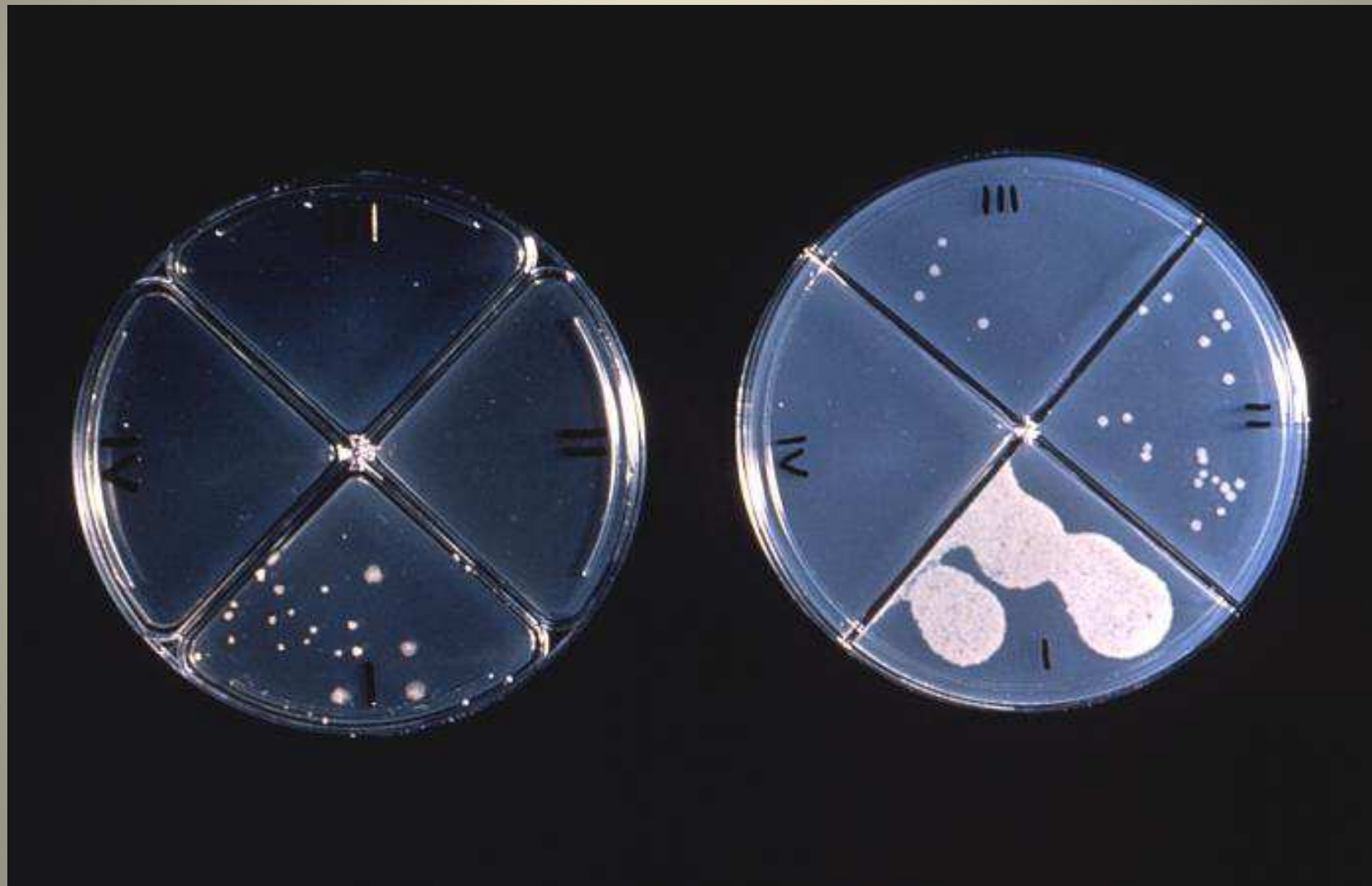
COMBINACION ½ LIQ. + ½ SOL.

80% CONVENCIONAL



80% BacT/ALERT

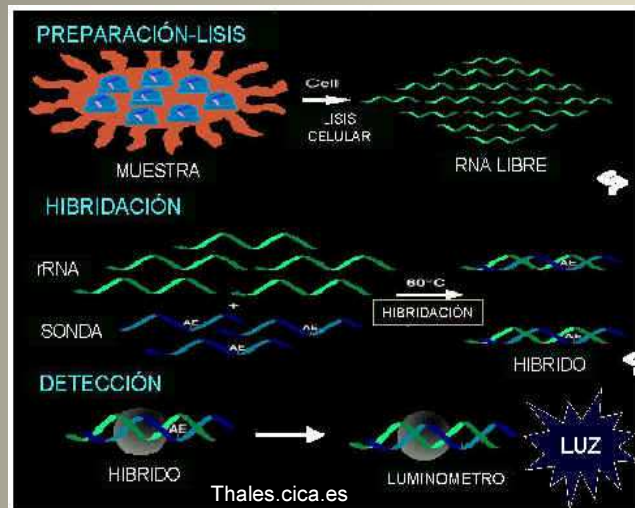
METODO DE CULTIVO EN CAPA DELGADA - MCD



SISTEMA MGIT(Mycobacterial Growth indicator tube)



Técnicas convencionales de detección de ácidos nucleicos



sondas
comerciales de ADN no
radiactivas

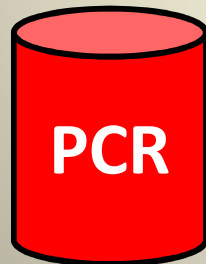
**TECNICA SENSILLA
TIEMPO REDUCIDO
SENSIBILIDAD Y
ESPECIFICIDAD
EXCELENTES**

**AISLAMIENTO
PREVIO
SONDAS
COMERCIALIZADAS
LIMITADAS
ORIENTACIÓN
PRESUNTIVA DESDE
EL CULTIVO**

Ensayos de amplificación genética con detección automática/semiautomáticas de ácidos nucleicos

Ensayos de sondas en línea

- PCR a tiempo real
- Xpert MTB/RIF



SIMPLE → partir de cultivos

COMPLICACIÓN: → muestra clínica



PCR a tiempo real

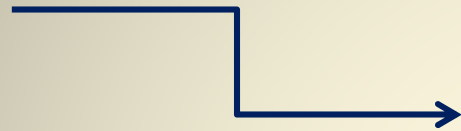
- ❖ **Amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado.**
- ❖ **Por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado.**

PCR muestras baciloscopías negativas

- Un **resultado negativo** no descarta tuberculosis activa
- Certeza diagnóstica, un **resultado positivo** debe ser confirmado con, al menos, una **segunda muestra** del mismo paciente tomada e investigada por el mismo laboratorio en un **día diferente**.
- **Dos pruebas positivas** en un paciente con sospecha de tuberculosis sostendrían la indicación de iniciar ó continuar el tratamiento específico.

Ensayos de sondas en línea

“INNO-LiPA” v2



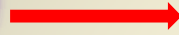
amplificación un fragmento del espacio intergenético 16S-23S del ARNr e incluye 16 sondas

“GenoType” amplifica el gen 23S del ARNr (“GenoType CM”) permite la identificación del complejo *M. tuberculosis* junto a 13 especies de micobacterias.

“GenoType AS”) que incluye 16 especies (“GenoType MTB”) para la identificación de las especies que forman el **complejo *M. tuberculosis***

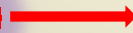
Ensayos de sondas en línea

UTILIDAD



muestras respiratorias con
baciloscopia positiva

INCONVENIEN
TES



No se recomienda: baciloscopia es
negativa
Pruebas caras y relativamente
laboriosas

PCR en tiempo real integrado en un cassette cerrado Xpert MTB/RIF (Cepheid Sunnyvale, CA)

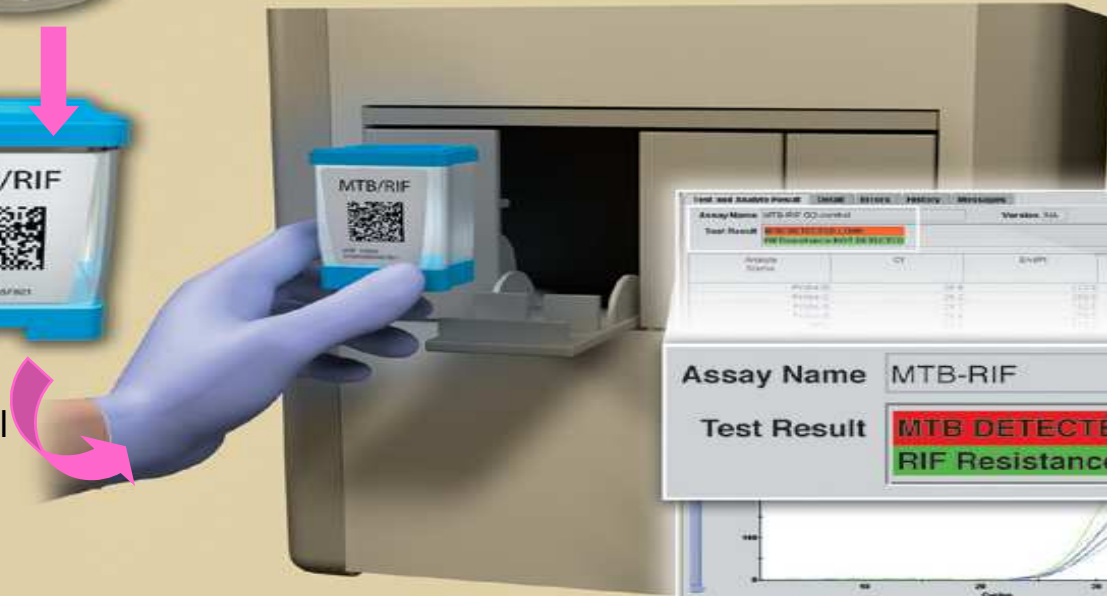
1- Licuefacción e inactivación del esputo



2- Carga de 2 ml de muestra en el cartucho



3- Introducción del cartucho dentro del aparato

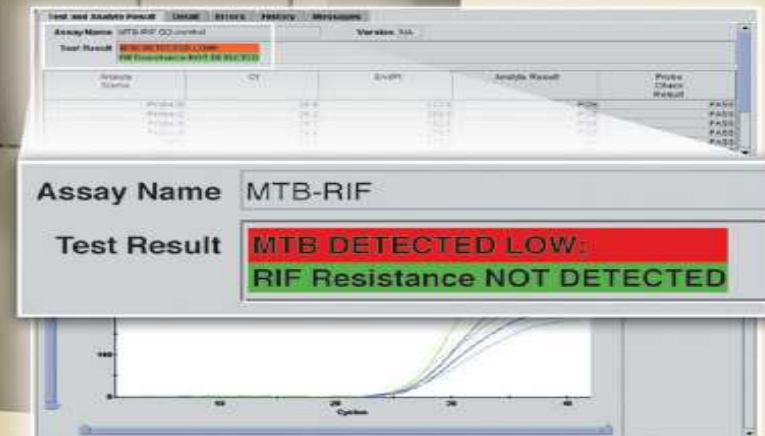


4- Filtración y lavado automático de la muestra

5- Lisis por ultrasonido y extracción del DNA

6- Mezcla de DNA con reactivos de PCR desecados

7- PCR hemi-nested con cuantificación fluorescente (PCR tiempo real)



Xpert MTB/RIF

FACIL MANEJO
RESULTADOS A LAS 2 HS
PACIENTES CON BACILOSCOPIÁS
POSITIVA Y NEGATIVAS
Se desconoce resultados en muestras
no respiratorias

Tecnologías que apoya la OMS

Características operativas y de rendimiento de las técnicas de detección de ácidos nucleicos

	Sondas de ácidos nucleicos	Ensayos de amplificación con detecc. auto/semiautomática	Ensayos de sondas en línea	PCR a tiempo real	Xpert MTB/RIF
Infraestructura	Mínima	Compleja	Compleja	Compleja	Mínima
Capacitación personal técnico	Media	Alta	Alta	Media	Mínima
Tiempo respuesta	2 horas	2,30-6 horas	1-2 días	3 horas	2 horas
Sensibilidad MTB muestra directa	-	+	+	ND	++*
Cribado MTB multirresistente	-	-	+	-/+**	+

MTB: M. tuberculosis

ND: No datos

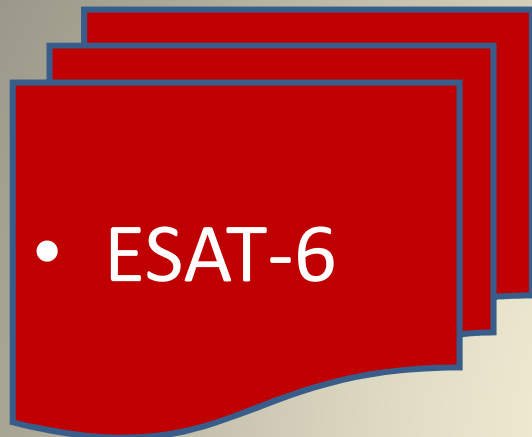
*Sensibilidad alta para muestras respiratorias con baciloscopia negativa. ** No hay datos sobre el cribado en muestra clínica.

**DETECCION DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA
*M.TUBERCULOSIS***

**PRUEBA DEL
DERIVADO
PROTEICO
PURIFICADO
(PPD)**

**DOSAJE DE
INTERFERON
GAMMA EN SANGRE**

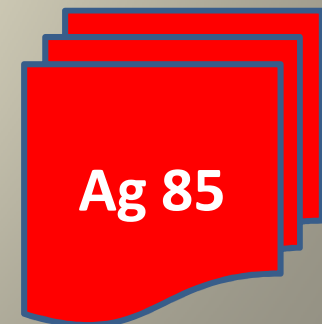
PRUEBAS DE INTERFERON GAMMA



T Spot-TB, Elispot



Quantiferon-TB Gold in-Tube



El complejo ESAT-6/CFP-10 es secretada por el sistema de secreción de ESX-1, también conocida como la región RD1

Rev. amer. med.respiratoria vol.12 no.2 CABA mar./jun. 2012

Controversias en el uso del derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) y las nuevas técnicas en la detección in vitro de los niveles de interferón gamma (IGRAs) en un país con alta tasa de infección por tuberculosis

IGRAS

Ventajas de IGRAs

Los resultados pueden estar disponibles en 24 horas
Los resultados no se ven afectados por la previa vacunación de [BCG](#)

NIÑOS: estudios muy limitados
Elispot mayor S que la tuberculina en áreas con alta prevalencia de VIH

No son útiles para diferenciar infección de enfermedad

LIMITACIONES

Las muestras de sangre deben ser procesadas dentro de 8 y 16 horas después de la colección. Factores que disminuyen la exactitud de la prueba incluyen errores en:

- recolección de muestras de sangre
- transporte de muestras de sangre
- ejecución e interpretación de la prueba

Exámenes de sangre de TB puede ser costosos

Medicina (B. Aires) v.69 n.3 mayo/jun. 2009

¿Es suficiente la prueba tuberculínica para el diagnóstico de la infección tuberculosa?

Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection --- United States, 2010 *Recommendations and Reports* June 25, 2010 / 59(RR05);1-25

Evento	Metodo evaluado	Resultado	Posicion OMS		Probable aporte a la vigilancia en paises con mediana/alta carga
			Recomendación	Año	
TB latente	IGRAs	Mas caro, no mejora sustancialmente la precision	NO reemplazar prueba de Mantoux por estos metodos en escenarios con recursos limitados	2011	NO RELEVANTE
TB altamente infecciosa (avanzada)	Microscopia de fluorescencia con iluminacion LED	↓ el tiempo de examen. Precision similar/controvertida	reemplazar progresivamente la microscopia convencional por este metodo	2010	NO RELEVANTE
TB menos infecciosa	Xpert MTB/RIF	Mas rapidos pero menos sensibles que el cultivo	emplear para la deteccion rapida de TB-HIV, extrapulmonar y pediátrica	2010 2013	Puede mostrar solo la punta del iceberg donde no esta disponible el cultivo

<http://www.stoptb.org/wg/gli/documents.as>

[D](#)

Barrera Lucia nuevas herramientas..

Detección de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente en un paciente pediátrico con coroiditis

- una lesión coroidea en el ojo izquierdo (OI), asintomática, blanquecina, ligeramente sobre elevada y de localización paramacular

Cultivos para bacterias, de orina y de líquido cefalorraquídeo → negativos.

test de Mantoux a las 48h → induración de 20mm

LCR → baciloscopía y el cultivo : negativos.

LG → baciloscopía y la detección de ARN de *Mycobacterium tuberculosis* mediante «Amplified MTD Gen-Probe®(bioMérieux)»
NEGATIVOS

21 días de incubación en los medios líquidos BacT/ALERT® MB (bioMérieux)



crecimiento de una micobacteria no cromógena, de crecimiento lento, que se identificó mediante sondas de hibridación «Amplified MTD Gen-Probe®(bioMérieux)» como *M. tuberculosis complex*.

Dosaje de Adenosina Deaminasa (ADA) en líquidos de lesión

detección del amonio liberado en la reacción enzimática

ADA \geq 60U/l para diferenciar a los casos de tuberculosis. sensibilidad de 84% especificidad de 94%,

VENTAJAS

- FACIL DE IMPLEMENTAR
- RÁPIDA
- BAJOS COSTOS

LIMITACIONES

- VALORES AUMENTADOS EN OTRAS PATOLOGÍAS
- CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS
- HEMÓLISIS

La actividad de ADA no reemplaza al cultivo ni a la punción biopsia pleural, que siguen siendo los procedimientos de elección para el diagnóstico.

Bongiovanni María Eugenia, Vera Oscar, Oldrino Marcela, Barnes Ana Isabel. Aporte de adenosina deaminasa como método indirecto para el diagnóstico de pleuresía tuberculosa *Exp Médica* 2004; 22(1) : 12-16

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

INDICACIONES

- Pacientes en fracaso terapéutico ó con historia de tratamiento previo, especialmente si este fue irregular y/ó incompleto.
- Pacientes HIV positivos.
- Personas en contacto con casos de TBMR en la comunidad, como internados, trabajadores de la salud ó de comunidades cerradas

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD- *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

- Método de las proporciones en Lowenstein Jensen
- Método de las proporciones en MGIT 960
- Nitrato reductasa ó nitrataasa ó método de Griess
- Métodos colorimétricos
- MODS** (del nombre en inglés microscopic observation drug susceptibility)

- Método de las proporciones en medio sólido de Lowestein Jensen, requiere 40 días para su observación.
- BACTEC 460 → reduce la lectura a 5 - 11 días rifampicina, e isoniacida, en segundo lugar son las más reproductibles, estreptomicina y etambutol necesidad de un programa de mejoramiento de la calidad
- Método no radiométrico BACTEC-MGIT 960 fue aprobado por la FDA por su eficiencia

OTROS METODOS FENOTÍPICOS

SENSILLO
ECONÓMICOS

➤ Con indicadores colorimétricos Redox

Detectan R a INH y RAMP en cultivo-
No comerciales y requieren entrenamiento

➤ Observación Microscópica de Sensibilidad a las drogas

Detectan R a INH y RAMP en cultivo líquido
Microscopio de luz invertida

MÉTODO DE LA NITRATASA

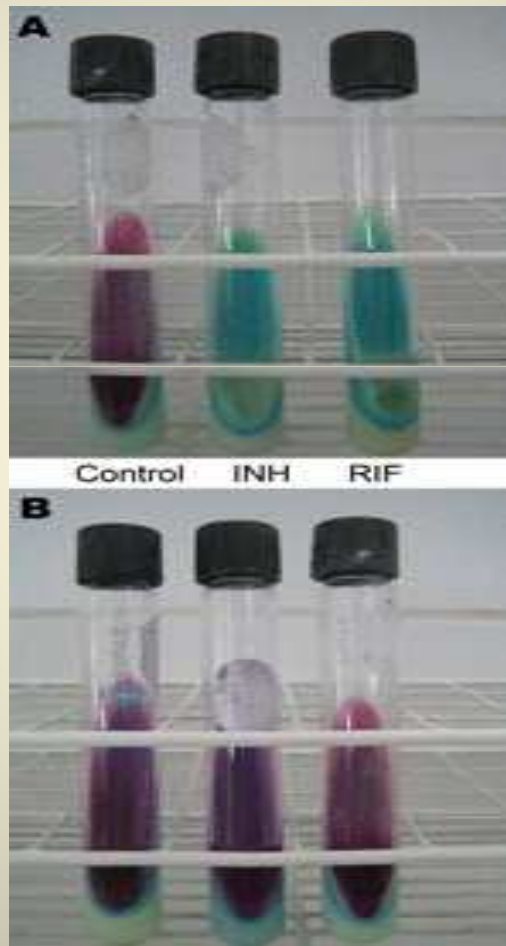
- **Muy útil para detectar resistencia a rifampicina e isoniacida, en 10 días a partir de cultivo positivo y 2-3 semanas en muestras 3+, con una eficiencia del 98%**

COMO SE REALIZA

Actividad de reducción de nitrato en el cultivo de *M. tuberculosis* en medio sólido L-J conteniendo NaNO_3 (1 g/l) con y sin droga

Utiliza colorantes y reactivos, en medio cultivo sólido de Löwenstein-Jensen.

NITRATASA



MÉTODO DE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MEDIO DE CULTIVOS -MODS

- cuerdas características en presencia del antibiótico.
- promedio de 10 días.
- específico, sensible, rápido y económico.
- microscopio de luz invertida no es parte del equipo habitual de un laboratorio de micobacterias.

- RESISTENCIA A RIFAMPICINA → **rpoB** en más del 95% de los casos.
- RESISTENCIA ISONIACIDA → **katG, inhA.**

katG enzima
catalasaperoxidasa
Codón 315
Alto nivel

inhA enzima enoil ACP
reductasa
Resistencia de bajo
nivel

“INNO-LiPA Rif Tb” identificar el complejo M. tuberculosis y la resistencia a rifampicina

“GenoType MTBDRplus” detecta el complejo M. tuberculosis

- y las resistencias a rifampicina e isonacida. sensibilidad (>90%) y especificidad (>95%) “GenoTyp MTBDRsl”

INTRODUCCIÓN DE MÉTODOS RÁPIDOS



- requiere una política racional que guíe la incorporación y aplicación de esta tecnología

Técnicas que han demostrado ser económicamente factibles de aplicar en laboratorios de escasos recursos

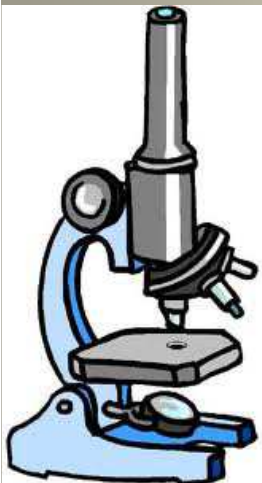
- ADA
- MICROSCOPIA-AGAR CAPA DELGADA
- NITRATO REDUCTASA

A TENER EN CUENTA



La Tb es una **enfermedad prevenible**, la mejor forma de evitarla es controlarla en quienes ya la tienen y la están manifestando.

Una de cada cinco personas afectadas con tuberculosis en América desconoce que tiene la enfermedad, ya sea por exclusión de los servicios de salud o por falta de detección adecuada, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2012)



- **Preocupan la acumulación de casos en los países más pobres, la aparición de cepas multiresistentes**

...

.....***MUCHAS GRACIAS***

.....