

Evaluación de una prueba rápida para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y otras seis especies de micobacterias atípicas directamente desde esputo

EVALUATION OF A RAPID TEST FOR THE IDENTIFICATION OF *Mycobacterium tuberculosis* AND SIX OTHER SPECIES OF ATYPICAL MYCOBACTERIA DIRECTLY FROM SPUTUM

Enrique Villegas (1), José Antonio Carrillo (2), Antonio Sorlózano (1), Juan Román (3), José Gutiérrez (1,4)

1) Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, Universidad de Granada

2) Laboratorio Vircell. Santa Fe, Granada

3) Servicio de Microbiología. Hospital Universitario San Cecilio, Granada

4) Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

Resumen

Introducción: El diagnóstico de tuberculosis y, en general, de la patología infecciosa causada por micobacterias, es un proceso lento, que retrasa considerablemente el inicio de un tratamiento antibiótico adecuado. El desarrollo de técnicas moleculares que permitan la detección e identificación de micobacterias directamente en la muestra clínica sería un procedimiento deseable para acortar este periodo.

Material y métodos: Se usaron siete cepas de referencia internacional de micobacterias para inocular, de forma artificial, esputos, y realizar pruebas que determinasen la capacidad del ensayo Speed-Oligo Micobacteria® para identificar dichas bacterias directamente, sin necesidad de sembrar las muestras en los medios de cultivo convencionales.

Resultados: El ensayo identificó correctamente las siete cepas utilizadas, incluso cuando las bacterias se encontraron en concentraciones inferiores a los límites de detección de la baciloscopia.

Conclusiones: El ensayo Speed-Oligo Micobacteria® podría ser válido para la detección e identificación directa de micobacterias en esputos, incluso en aquellos que presentan una baciloscopia negativa.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas, Speed-Oligo Micobacteria®.

Abstract

Introduction: The diagnosis of tuberculosis and, in general, infectious disease caused by mycobacteria is a slow process, which significantly delayed the initiation of appropriate antibiotic therapy. The development of molecular techniques that allow detection and identification of mycobacteria directly from clinical specimen would be a desirable to shorten this period.

Material and methods: We used seven international reference strains of mycobacteria to inoculate, artificially, sputum, and perform tests that determine the ability of the Oligo Speed Mycobacteria® to identify the bacteria directly, without having to grow the samples in conventional culture media.

Results: The test correctly identified seven strains used, even when the bacteria were found at concentrations below the detection limits of the smear.

Conclusions: The Speed-Oligo Mycobacteria® could be valid for the direct detection and identification of mycobacteria in sputum, including those with a negative smear

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, non-tuberculous mycobacteria, Speed-Oligo Micobacteria®.

1. Introducción

Las micobacterias son uno de los grupos bacterianos de mayor relevancia clínica, ya que son causa de infecciones que presentan una elevada morbi-mortalidad. Según datos del año 2009 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 9,3 millones de personas son diagnosticadas anualmente de tuberculosis, y 1,7 millones fallecen como consecuencia de esta enfermedad (1). Estas cifras, al compararse con las expuestas por la OMS para años anteriores, reflejan un incremento constante de las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, pero también, de forma paralela, se observa un aumento considerable de la incidencia de infecciones por micobacterias no tuberculosas o atípicas, especialmente de especies como *Mycobacterium avium-intracellulare* o *Mycobacterium kansasii*, implicadas en infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos (especialmente en pacientes con SIDA) o pacientes con patología pulmonar crónica, fundamentalmente (2).

El diagnóstico de tuberculosis pulmonar y, en general, de la patología respiratoria causada por micobacterias, se inicia con el examen microscópico del esputo, para detectar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). La baciloscopia con auramina-rodamina es, de entre los métodos recomendados para la detección de micobacterias en esputo, uno de los que tienen mayor sensibilidad (3). Sin embargo, para el diagnóstico definitivo de infección por micobacterias es imprescindible el aislamiento bacteriano en medios de cultivo específicos. Dicho cultivo presenta importantes inconvenientes, como el elevado riesgo de contaminación o, especialmente, el prolongado tiempo necesario para que crezcan las bacterias, lo cual puede retrasar considerablemente el comienzo de un tratamiento antibiótico adecuado, sobre todo en aquellas muestras cuya baciloscopia sea negativa (4).

En general, los avances en las técnicas de Biología Molecular han favorecido el desarrollo de pruebas que permiten acortar el tiempo de diagnóstico, lo que es particularmente relevante cuando hablamos de infecciones por micobacterias. Actualmente existen comercializados kits de diagnóstico que, mediante el uso de sondas específicas, detectan ADN de *M. tuberculosis* complex, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae* a partir de colonias crecidas en los

medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos. Normalmente estas pruebas están basadas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) y la posterior hibridación de los amplificados usando sondas específicas situadas sobre un soporte sólido (5,6). Sin embargo, esta metodología no acorta, de una forma significativa, el tiempo necesario para la identificación, ya que hay que esperar al crecimiento bacteriano en el cultivo, que es el factor limitante fundamental que enlentece el proceso diagnóstico. Es necesario, por tanto, que se desarrollen técnicas moleculares de diagnóstico rápido, que mantengan una elevada sensibilidad y especificidad, y que permitan la detección de las diferentes especies de micobacterias directamente desde el esputo o cualquier otra muestra clínica. Este tipo de pruebas sí conseguirían reducir de una forma considerable el tiempo de identificación bacteriana y, por tanto, de instauración de un tratamiento adecuado.

El ensayo Speed-Oligo Micobacteria® (Vircell, Granada) es una prueba basada en la PCR, que amplifica la región ITS (*Internal Transcribed Spacers*) contenida entre los genes ribosomales 16S-23S de diferentes especies de micobacterias, y que permite la identificación posterior mediante la hibridación de los amplificados con sondas específicas unidas a un soporte sólido de papel o dipstick. Si bien, esta metodología ha sido desarrollada inicialmente para realizar la identificación a partir del crecimiento bacteriano en medios de cultivo, podría también tener una elevada capacidad para identificar diferentes especies de micobacterias directamente en la muestra clínica.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad del ensayo Speed-Oligo Micobacteria® para identificar siete especies de micobacterias de relevancia clínica [*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* y *M. gordonae*] directamente desde muestras de esputo, como una aplicación adicional a aquella para la que originariamente fue diseñado.

2. Materiales y métodos

CEPAS DE REFERENCIA

Para la realización de los ensayos se utilizaron siete cepas de referencia de micobacterias: *M. tuberculosis* (NCTC 13144), *M. avium* (NCTC 13034), *M. intracellulare* (NCTC 13025), *M.*

gordonae (NCTC 10267), *M. chelonae* (NCTC 946), *M. fortuitum* (NCTC 10394) y *M. kansasii* (NCTC 13024), todas ellas de la colección inglesa de cultivos tipo (NCTC, Salisbury, Reino Unido).

Las siete cepas fueron cultivadas en medio Löwenstein-Jensen hasta obtener crecimiento bacteriano. Posteriormente se prepararon suspensiones de cada microorganismo en 1 ml de solución salina estéril ajustando a una turbidez de 0,5 en la escala McFarland (equivalente a $0,6 \times 10^8$ UFC/ml).

PREPARACIÓN ARTIFICIAL DEL ESPUTO

Se usaron 18 esputos a partir de muestras clínicas de este tipo recibidas en el Servicio de Microbiología del Hospital San Cecilio de Granada para diagnóstico de infección de vías respiratorias bajas, en ausencia de sospecha clínica de tuberculosis. De cada esputo se congeló, a -20°C , un volumen igual a 1 ml. El volumen restante de cada esputo continuó el procedimiento habitual de detección de patógenos respiratorios comunes, siguiendo el protocolo de actuación del Laboratorio de Microbiología del citado hospital. Además, a todos estos esputos se les realizó una baciloscopia con auramina-rodamina y se cultivaron en medios específicos, sólidos y líquidos, para crecimiento de micobacterias. En los 18 esputos la baciloscopia fue negativa (no se observó presencia de BAAR) y no hubo crecimiento de micobacterias en los cultivos, por lo que las alícuotas de 1 ml fueron descongeladas y usadas en el procedimiento posterior de evaluación del Speed-Oligo Micobacteria®. Estos esputos se sometieron a un proceso de digestión y descontaminación con un volumen igual (1 ml) de N-acetil-L-cisteína e hidróxido sódico al 3%, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras este periodo, se adicionó la suspensión previamente preparada con las micobacterias al 0,5 de la escala McFarland, diluyendo a una proporción 1:100 en cada mililitro de esputo digerido y descontaminado. De esta forma se obtuvieron unas suspensiones finales equivalentes a $0,6 \times 10^4$, $0,6 \times 10^2$, $0,6 \times 10^0$, $0,6 \times 10^{-2}$ y $0,6 \times 10^{-4}$ UFC/ml para cada micobacteria, en un total de 35 alícuotas: cinco suspensiones para cada especie de micobacteria incluida en el estudio.

Diez microlitros de cada una de estas alícuotas fueron examinadas al microscopio de luz ultravioleta tras tinción con auramina-rodamina para detectar la presencia de los BAAR artificialmente incorporados.

EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN en las 35 suspensiones descritas se realizó siguiendo las mismas instrucciones que el fabricante describe para la técnica, cuando ésta se realiza desde cultivo. En primer lugar, se centrifugó un mililitro de cada suspensión durante 15 minutos a 12000 g. El sedimento fue resuspendido en 300 μl de "Vircell Sample Solution" y calentado durante 1 hora a 95°C . Para garantizar la ruptura de la membrana bacteriana y la extracción del ADN, se realizó un paso adicional a las recomendaciones del fabricante, añadiendo a la mezcla 100 μl de perlas de vidrio de 0,1 mm (BioSpec Products, Bartlesville, OK, EEUU) y agitando durante 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron nuevamente centrifugadas durante 15 minutos a 12000 g. Diez microlitros del sobrenadante se usaron en la correspondiente PCR.

SPEED-OLIGO MICOBACTERIA®

La PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, en un termociclador Eppendorf® Mastercycler. Las condiciones fueron: 1 ciclo de 92°C durante 1 minuto; 40 ciclos de 92°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; un periodo final de extensión de 72°C durante 1 minuto y un paso de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, previo a la hibridación.

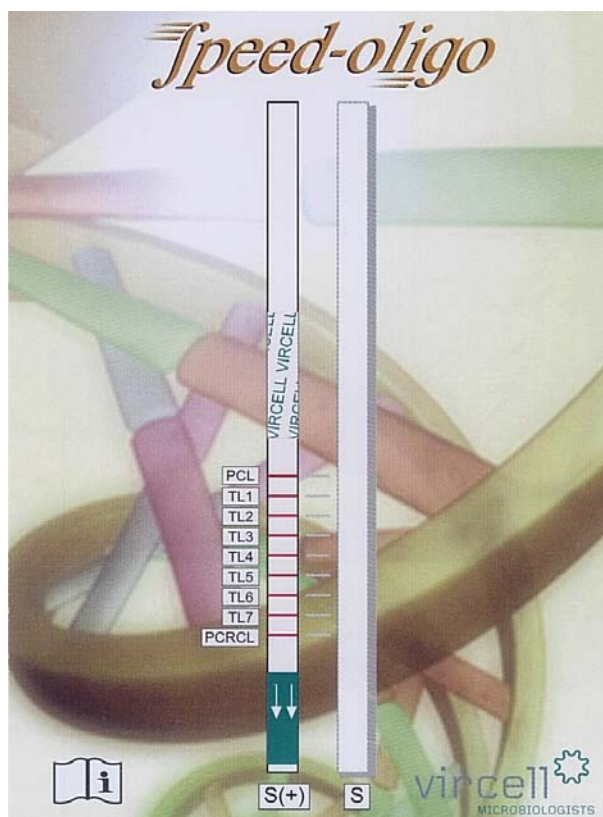


Figura 1: Tarjeta proporcionada en el kit para la interpretación de los resultados

La hibridación, sobre sondas específicas de especie, y la posterior detección por revelado, se realizó sobre el soporte sólido o dipstick que proporciona el fabricante, y se realizó según las instrucciones del mismo. Como muestra la figura 1, dicho soporte sólido incluye 9 líneas: una línea control del producto (PCL) para comprobar que todo el proceso de preparación de la muestra y la extracción del ADN son correctos; una línea control de amplificación de la PCR (PCRCL) para comprobar la ausencia de inhibidores de la reacción; una línea de detección del género *Mycobacterium* (TL7); y seis líneas para la detección de otras tantas especies de micobacterias (TL1 a TL6). Así, una vez realizada la hibridación del producto de PCR, la aparición de una banda de color rojo en la línea TL1 indicaría la identificación del complejo *M. abscessus-chelonae*, la banda roja en TL2 indicaría la identificación de *M. gordonae*, en TL3 se identificaría *M. kansasii*, en TL4 el complejo *M. tuberculosis*, en TL5 el complejo *M. avium-intracellulare*, y, por último, una banda roja en TL6 indicaría la identificación de *M. fortuitum*.

3. Resultados

Tras la realización de la técnica descrita, en las siete cepas de micobacterias de referencia, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 2. Las cepas *M. tuberculosis* (NCTC 13144) y *M. gordonae* (NCTC 10267) fueron detectadas hasta una suspensión igual a $0,6 \times 10^0$ UFC/ml. *M. avium* (NCTC 13034), *M. intracellulare* (NCTC 13025), *M. chelonae* (NCTC 946) y *M. fortuitum* (NCTC 10394) fueron detectadas hasta una suspensión igual a $0,6 \times 10^2$ UFC/ml. La cepa de *M. kansasii* (NCTC 13024) fue detectada hasta una suspensión igual a $0,6 \times 10^4$ UFC/ml.

Todas las suspensiones, desde 10^2 a 10^4 UFC/ml, para todas las micobacterias, tuvieron una baciloscopia negativa, es decir, no se observó presencia de BAAR. Únicamente, las muestras con una concentración final igual a $0,6 \times 10^4$ UFC/ml fueron débilmente positivas, observándose entre 1 y 10 BAAR en 100 campos.

4. Discusión

El incremento de la incidencia de tuberculosis y, en general, de las infecciones por micobacterias, ha favorecido el desarrollo comercial de equipos que detectan ADN de estas bacterias en

muestras clínicas mediante tecnología basada en la PCR. La capacidad diagnóstica de estas técnicas depende, tanto de la secuencia diana seleccionada para tal fin, como de la eficiencia del procedimiento de extracción del ácido nucleico.

Algunas de las técnicas que se han desarrollado han utilizado la detección de la secuencia repetitiva IS6110 (7) o del ARN ribosomal (8) como diana para mejorar la sensibilidad de la identificación de *M. tuberculosis*, lo que permite la detección a partir de una pequeña carga bacteriana presente en las muestras clínicas (9). Por otro lado, se han usado muy diversos métodos de extracción de ADN, tanto comerciales, como "in house". Los métodos "in house" se pueden clasificar en métodos físicos (como hervir en agua destilada, o lisar con pequeñas perlas de vidrio, o lisar mediante sonicación), métodos químicos (como el uso de bromuro de cetiltrimetil amonio, de hidróxido sódico, de proteinasa K o de fenol-cloroformo), o, incluso, una combinación de varios (10). También es importante considerar en el desarrollo de este tipo de técnicas, la posible presencia de factores inhibidores de la PCR. Los procesos de extracción y purificación del ADN mediante columnas deberían garantizar, en la medida de lo posible, la ausencia de restos y sustancias inhibitoras. En nuestro estudio, con esta finalidad, combinamos métodos físicos y químicos; específicamente, usamos una adaptación del método recomendado en el ensayo Speed-Oligo Micobacteria® para la extracción del ADN, añadiendo perlas de vidrio de 0,1 mm y agitando antes de la centrifugación final.

Como muestra la figura 2, para todas las cepas incluidas en el ensayo, y en todas las suspensiones, las líneas PCL fueron visibles, indicando la correcta realización de la técnica. Las líneas PCRCL mostraron, también en todos los casos, una fuerte señal positiva, que indicaba la ausencia de componentes inhibidores de la PCR. La línea de detección de *Mycobacterium spp.* (TL7) también se pudo visualizar en todos los casos, indicando que las preparaciones habían sido correctamente realizadas, así como la extracción del ADN bacteriano y que, por tanto, los resultados de las pruebas eran válidos. Para todas las cepas fue visible la banda de hibridación en las líneas esperadas (líneas TL1 a TL6) dependiendo de la especie incluida en cada ensayo, mostrando un 100% de concordancia. Por tanto, según el procedimiento empleado, y usando cepas de referencia, el ensayo Speed Oligo Micobacteria® fue capaz de detectar hasta $0,6 \times 10^0$ UFC/ml de *M. tuberculosis* y *M.*

gordonae, hasta $0,6 \times 10^2$ UFC/ml de *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, y hasta $0,6 \times 10^4$ UFC/ml de *M. kansasii*. Estos resultados muestran, así, una elevada sensibilidad en la detección e identificación de estas especies de micobacterias en esputos con baciloscopia negativa. Específicamente, el límite de detección de *M. tuberculosis* mostró una sensibilidad superior a la de otras muchas pruebas de identificación molecular, que han estimado sus límites de detección en 10 UFC/ml en esputo (11), o en la visualización de 10 BAAR por 100 campos con tinción con auramina-rodamina (12) o en 10 copias de ADN genómico de micobacterias (2). Sin embargo, la sensibilidad disminuyó en el caso de *M. kansasii*, aunque mostró una eficacia satisfactoria, puesto que este nivel de sensibilidad equivaldría a un esputo negativo o débilmente positivo en una baciloscopia con auramina-rodamina, puesto que se estima que una muestra requiere entre 5000 y 10000 bacterias/ml para considerarse visible en esta tinción (13).

Varios estudios, utilizando ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, han obtenido unos resultados de sensibilidad en torno al 95% para la identificación de micobacterias a partir de muestras respiratorias con baciloscopia positiva (13), pero este valor decrece y varía ampliamente, entre 33% y 96%, cuando se trata de muestras con baciloscopia negativa (14,15). Por eso, nuestros resultados son alentadores, ya que el ensayo Speed-Oligo Mycobacteria® fue capaz de identificar siete especies diferentes de micobacterias directamente en esputos con baciloscopias negativas.

Finalmente, el ensayo Speed-Oligo Mycobacteria® es de fácil aplicación y proporciona una rápida detección. Los resultados pueden obtenerse en 2 horas, frente a otros métodos comerciales, también basados en la amplificación de ácidos nucleicos, pero que dependen del crecimiento de la bacteria en cultivo (11,12).

En conclusión, aunque el ensayo Speed-Oligo Mycobacteria® ha sido diseñado para ser usado en muestras de cultivo, el comportamiento con muestras artificiales es correcto y podría ser válido para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas. Un resultado positivo precoz tiene un gran potencial de aplicación clínica porque facilita decisiones rápidas, tanto clínicas como terapéuticas. Estos resultados, comparados con los obtenidos con otras técnicas más sofisticadas, y que requieren más tiempo, indican una alta sensibilidad, que permitiría un uso clínico adecuado y eficiente de este ensayo.

Referencias

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Epidemiology, Strategy, Financing. WHO Report. WHO/HTM/TB/2009.411.
2. Wu TL, Chia JH, Kuo AJ, Su LH, Wu TS, Lai HC. Rapid identification of mycobacteria from smear-positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2008; 46: 3591-4.
3. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 367-416.
4. Kim S, Park EM, Kwon OJ, Lee JH, Ki CS, Lee NY, et al. Direct application of the PCR restriction analysis method for identifying NTM species in AFB smear-positive respiratory specimens. Int J Tuberc Lung Dis 2008; 12: 1344-6.
5. Mäkinen J, Sarkola A, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Evaluation of genotype and LiPA MYCOBACTERIA

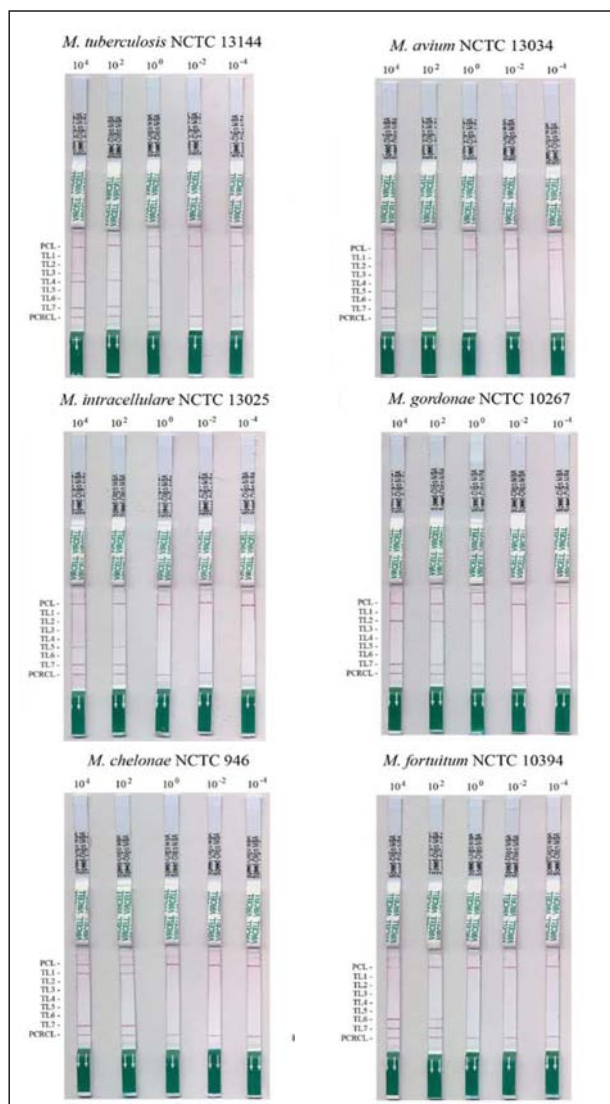


Figura 2: Resultados del ensayo Speed-Oligo Mycobacteria® para cada cepa de referencia y concentraciones empleadas

assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. J Clin Microbiol 2002; 40: 3478-81.

6. Park H, Jang H, Song E, Chang CL, Lee M, Jeong S, et al. Detection and genotyping of *Mycobacterium* species from clinical isolates and specimens by oligonucleotide array. J Clin Microbiol 2005; 43: 1782-8.

7. Nolte FS, Metchock B, McGowan JE, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993; 31: 1777-82.

8. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1993; 31: 2410-6.

9. Lemaitre N, Armand S, Vachee A, Capilliez O, Dumoulin C, Courcol RJ. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. J Clin Microbiol 2004; 42: 4307-9.

10. Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. Veterinarni Medicina 2006; 51: 180-92.

11. Takamura S, Tsuchiya S, Isawa Y, Yasukawa K, Hayashi T, Tomita M, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system. J Clin Microbiol 2005; 43: 5435-9.

12. 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.

13. Syre H, Myneedu VP, Arora VK, Grewal HM. Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid amplification tests, the gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and the genotype mycobacteria direct test. J Clin Microbiol 2009; 47: 3635-9.

14. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3:e1536.

15. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56: 103-11.