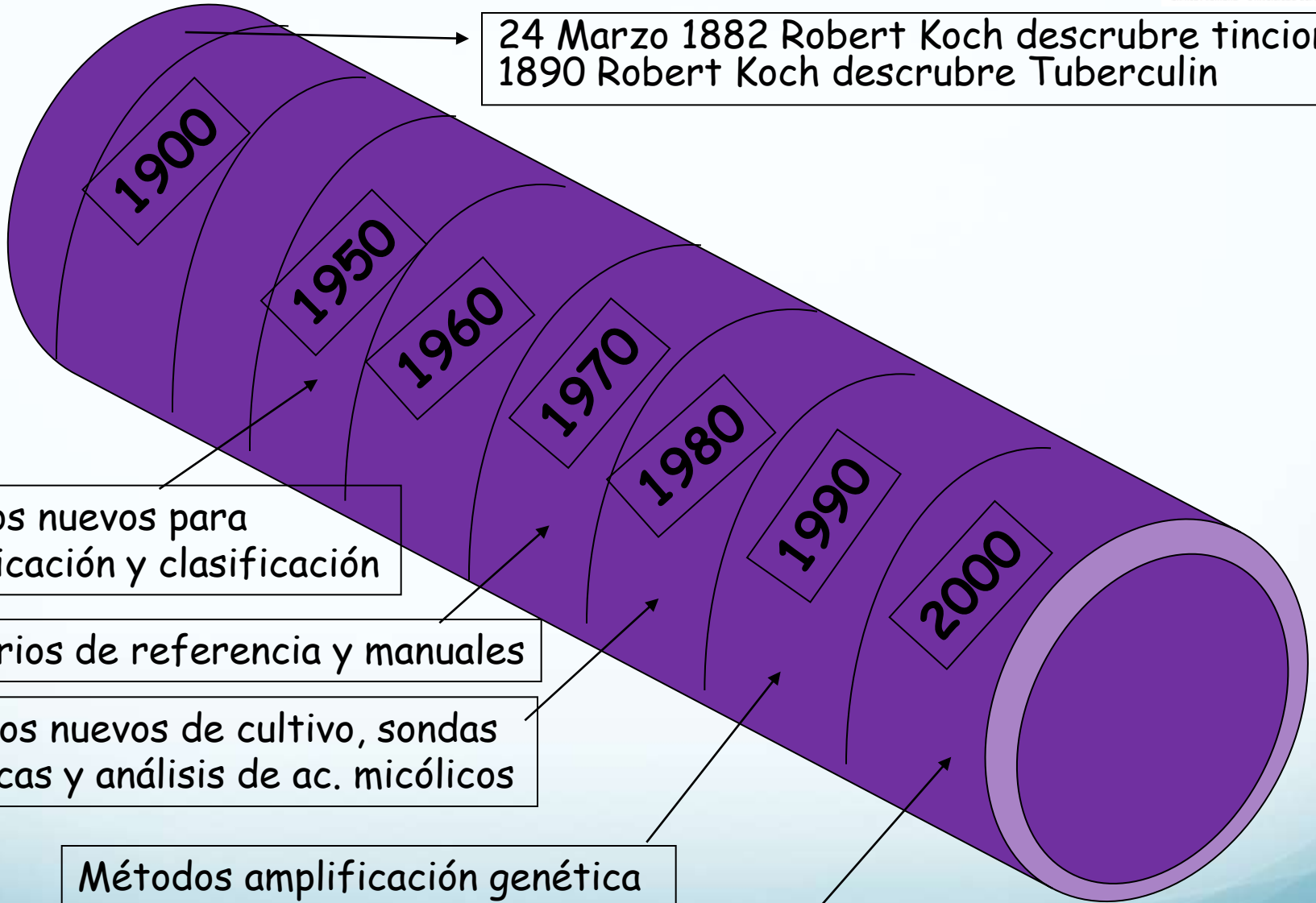


# El Laboratorio en el diagnóstico de las tuberculosis y Micobacterias atípicas: Herramientas diagnósticas disponibles en Chile

Dra. Patricia González A.  
Médico Microbiólogo Laboratorio Clínica Alemana  
Facultad de Medicina Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo

# LABORATORIO DE MICOBACTERIA

24 Marzo 1882 Robert Koch descubre tinción  
1890 Robert Koch descubre Tuberculin



Métodos nuevos para identificación y clasificación

Laboratorios de referencia y manuales

Métodos nuevos de cultivo, sondas genéticas y análisis de ac. micólicos

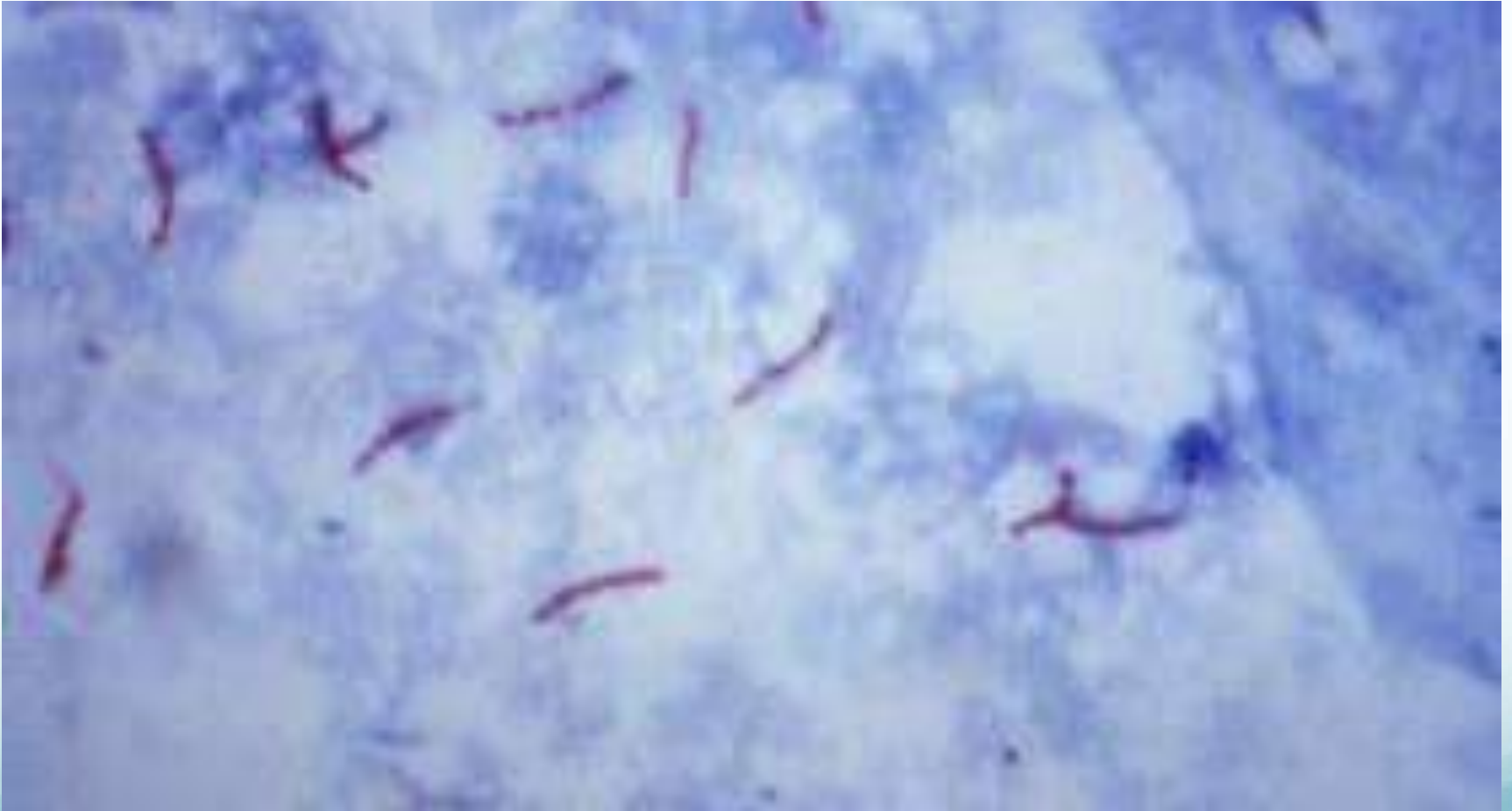
Métodos amplificación genética para detección, genotipificación

PCR tiempo real, GIRA secuenciación .....

# Diagnóstico Microbiológico de enfermedad tuberculosa

- Detección de agente
  - Directa de la muestra
    - Microscopía (masa crítica)
    - Amplificación ácidos nucleicos
- Aislamiento del agente
  - Cultivo convencional
  - Cultivo automatizado

# Diagnostico Microscópico



# BACILOSCOPIA

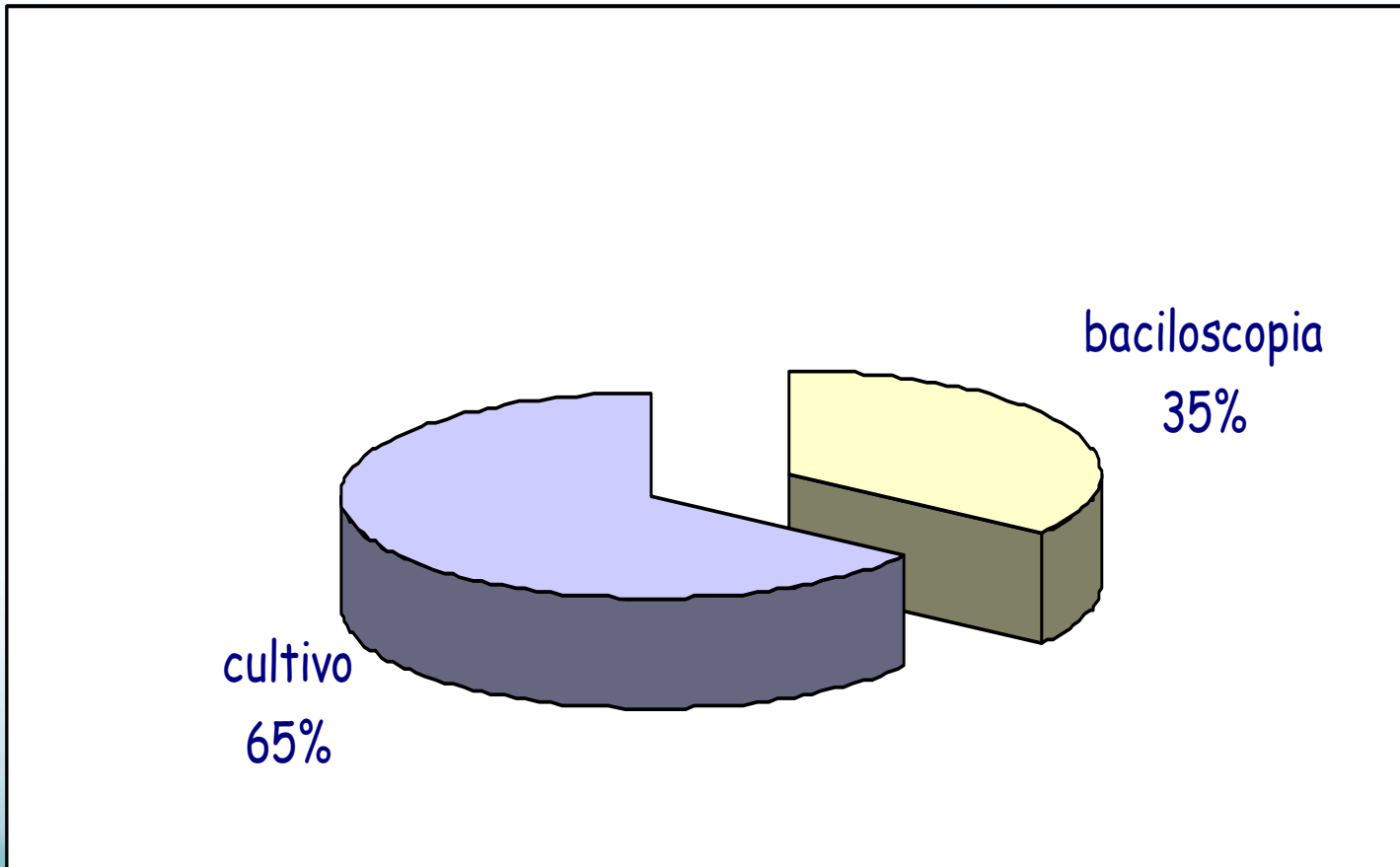
## Muestra directa

- Técnica fácil y rápida
- Sin procesamiento de muestra
- Permite tamizaje de pacientes
- Evalúa grado de infectividad

## Muestra procesada

- Técnica de referencia
- Necesita equipamiento básico
- Requiere procesamiento de muestra
- Descarta paciente bacilífero

# Rendimiento microbiológico en infección por *M. tuberculosis complex* Clínica Alemana



# Optimización del rendimiento en cultivo de micobacterias

- Aumentar el aislamiento
  - Obtención de muestra representativa
  - Reducir la contaminación de la muestra
  - Selección de una adecuada técnica de descontaminación
  
- Aumentar velocidad de crecimiento
  - Reducción del efecto de descontaminación
  - Selección de medio de cultivo
  - Sistema de detección de crecimiento

# Procesamiento de una Muestra Contaminada

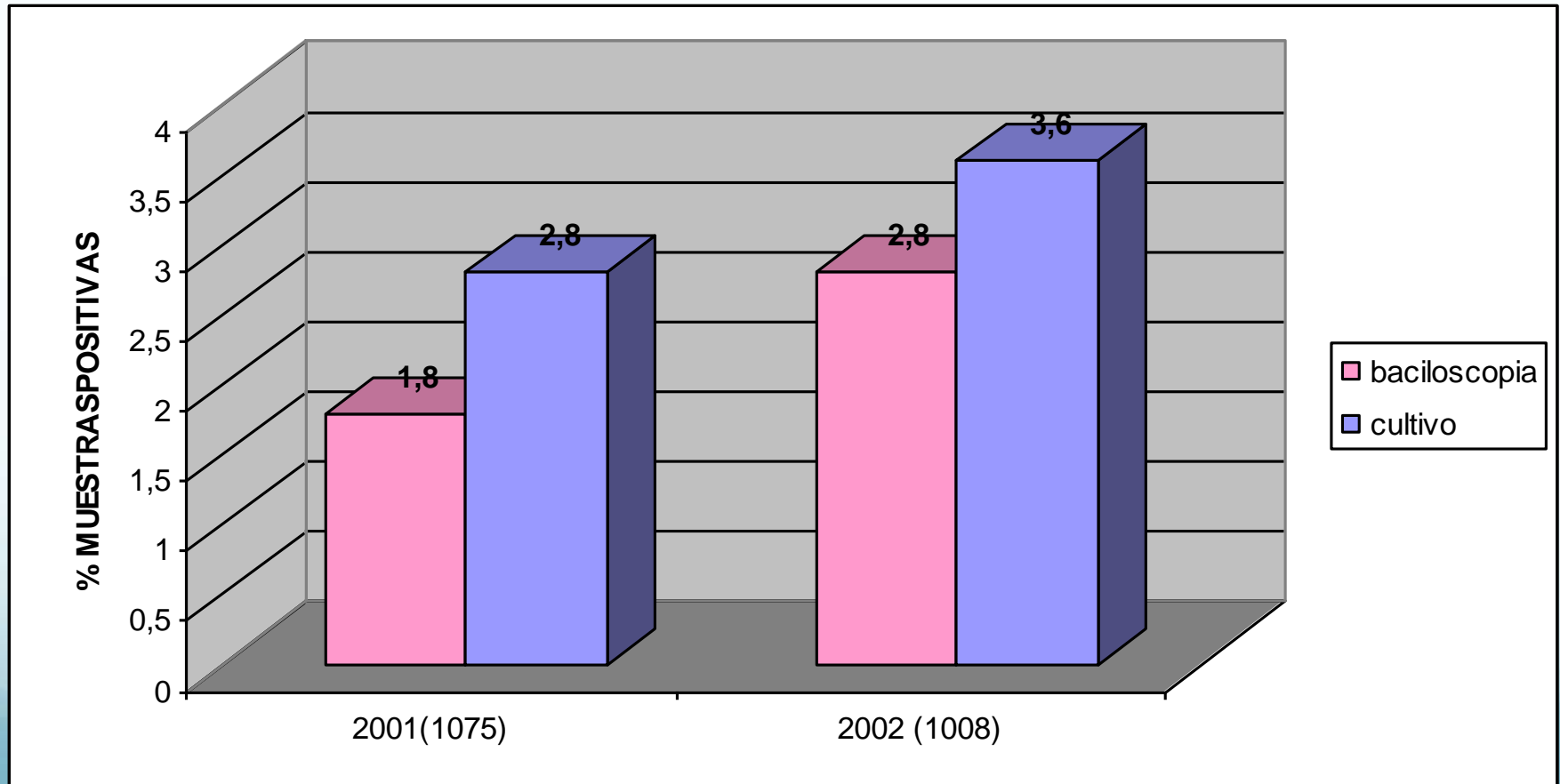
- Acción mucolítica
- Acción descontaminante
- Tiempo de exposición
- Fase de neutralización
- Centrifugación etapa crítica



# Métodos de Descontaminación

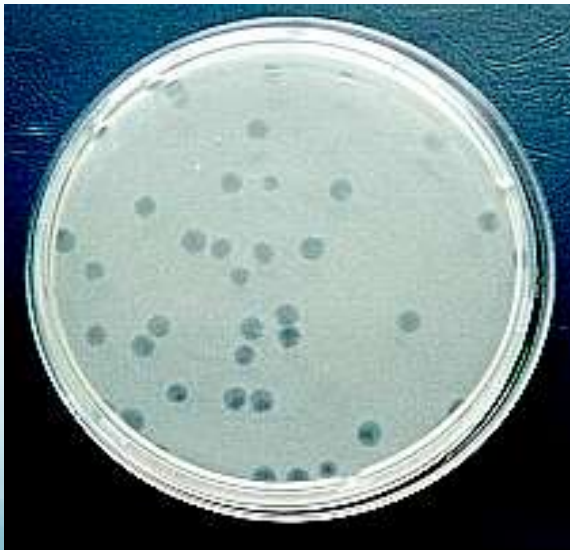
- Petroff: NaOH 4% 20-30 min
- NALC-NaOH 2% 15 min
- Ac. oxálico 5% 30 min
- Ac. sulfúrico 4% 10-20 min

# Comparación de dos métodos de descontaminación para estudio de Micobacterias



# Aumento de aislamiento Micobacterias

- ◆ Adecuada toma de muestra  
(representatividad, contaminación)
- ◆ Selección de una técnica de  
procesamiento adecuada a realidad local
- ◆ Incorporación de nuevos medios de  
cultivos
- ◆ Método de cultivo automatizado



**BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup>**  
**Mycobacteria Growth**  
**Indicator Tube**



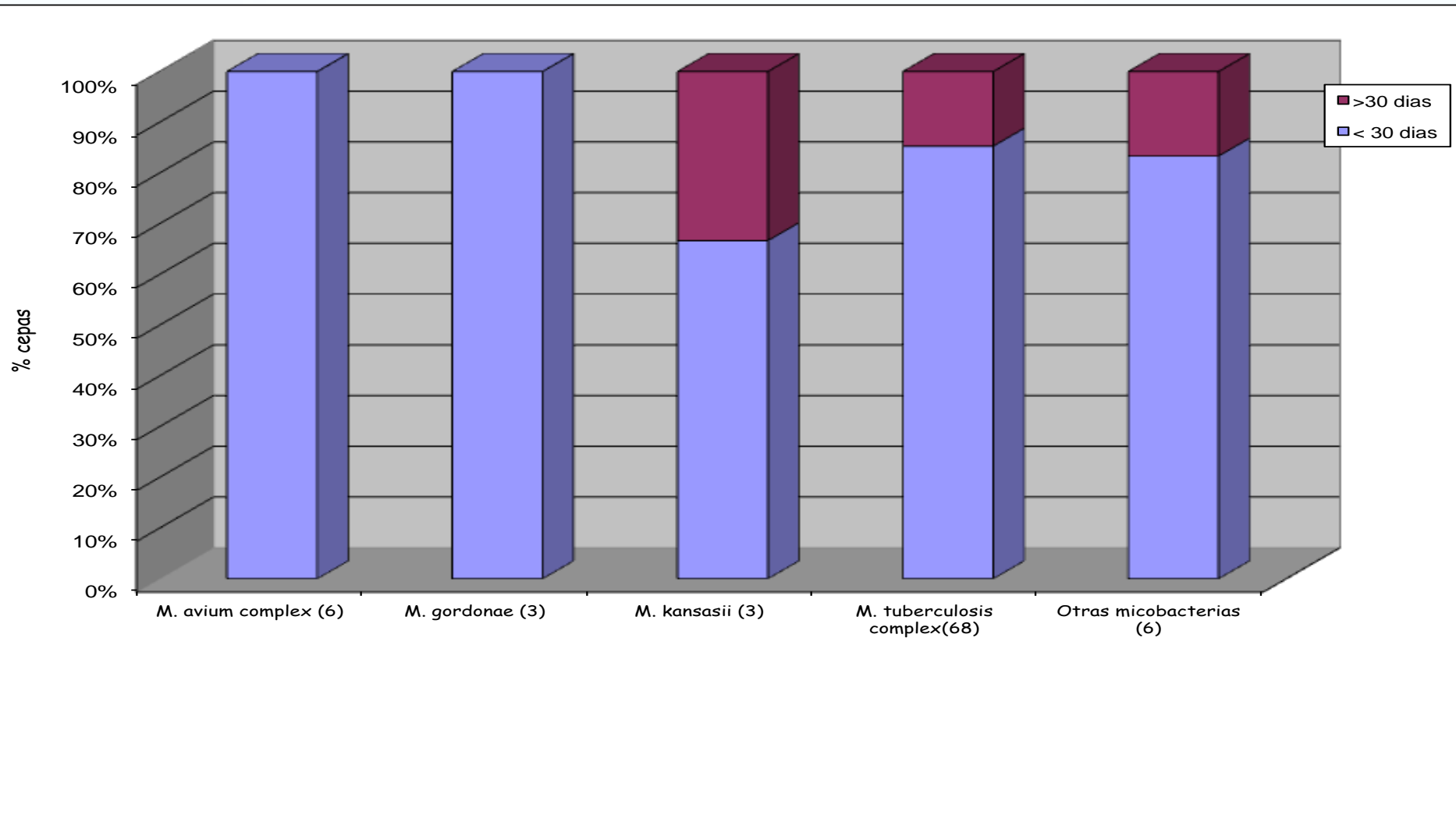
# Sistema automatizado de detección Micobacterias

## VENTAJAS

- Mayor Sensibilidad que medios sólidos
- Aumenta recuperación de M. No tuberculosa
- Mayor Rapidez en detección de crecimiento
  - *M. tuberculosis* 2-3 semanas
  - M. No tuberculosas 1-2 semanas
- Monitoreo continuo de crecimiento
- Permite identificación a partir de botella
- Estudio de sensibilidad a drogas antituberculosas



# Velocidad detección de crecimiento de cultivo automatizado de micobacterias

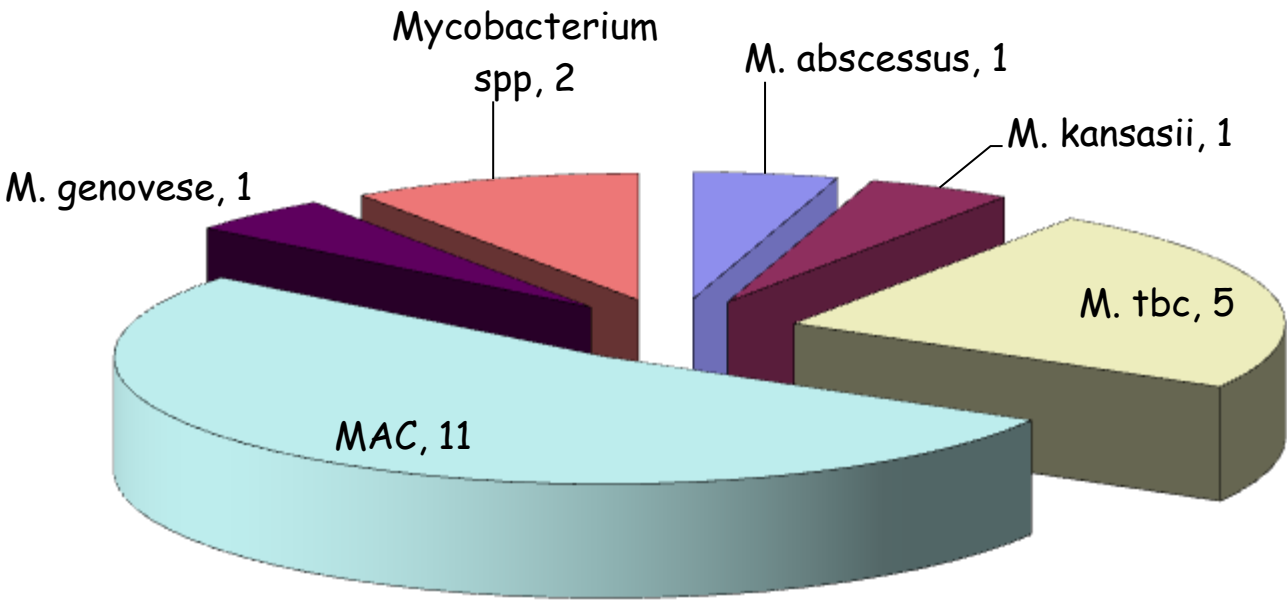


# Sistema automatizado de detección Micobacterias

## LIMITACIONES

- Mayores tasas de contaminación
- Dificultad para reconocer cultivos mixtos
- Incapacidad de observar morfología y cuantificación
- Obliga a tener sistema de identificación rápida
- No reemplaza a sistema convencional

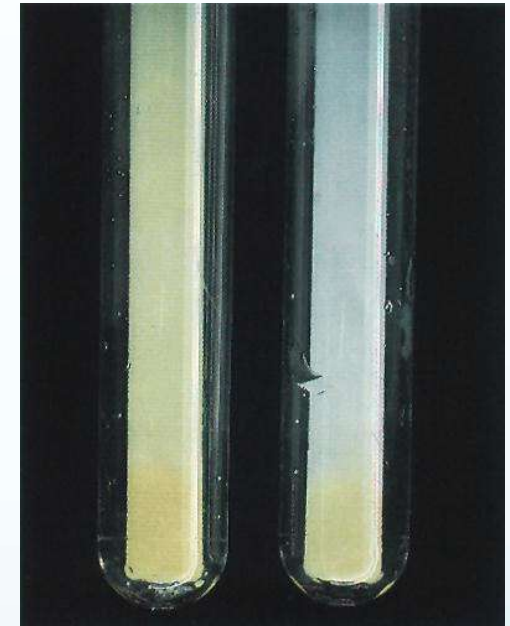
# Pacientes con infección por Micobacterias Diciembre 2008- Abril 2010



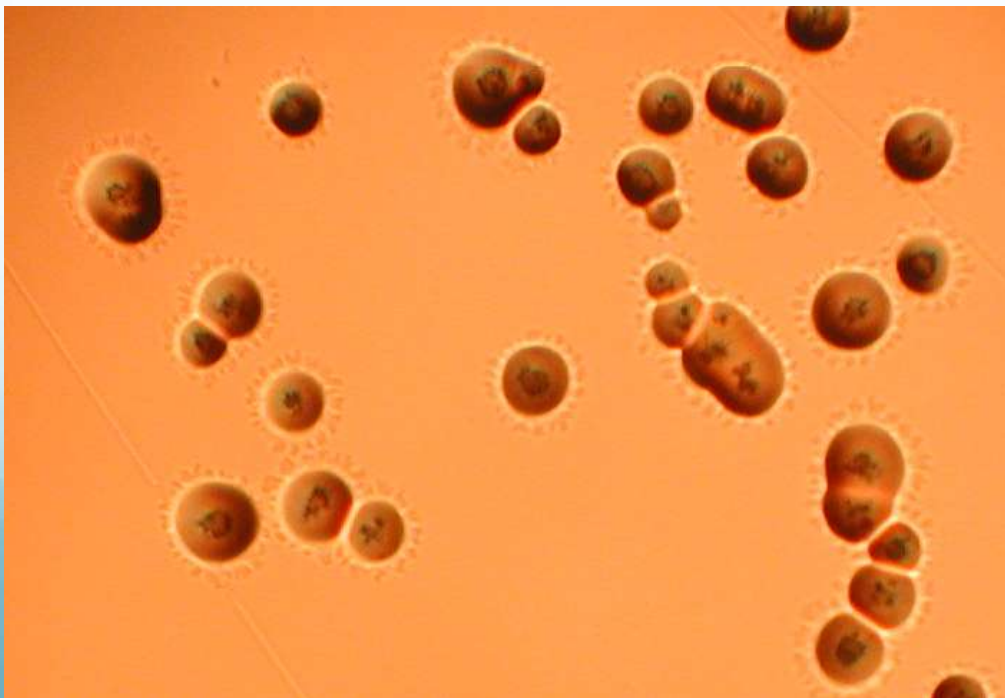
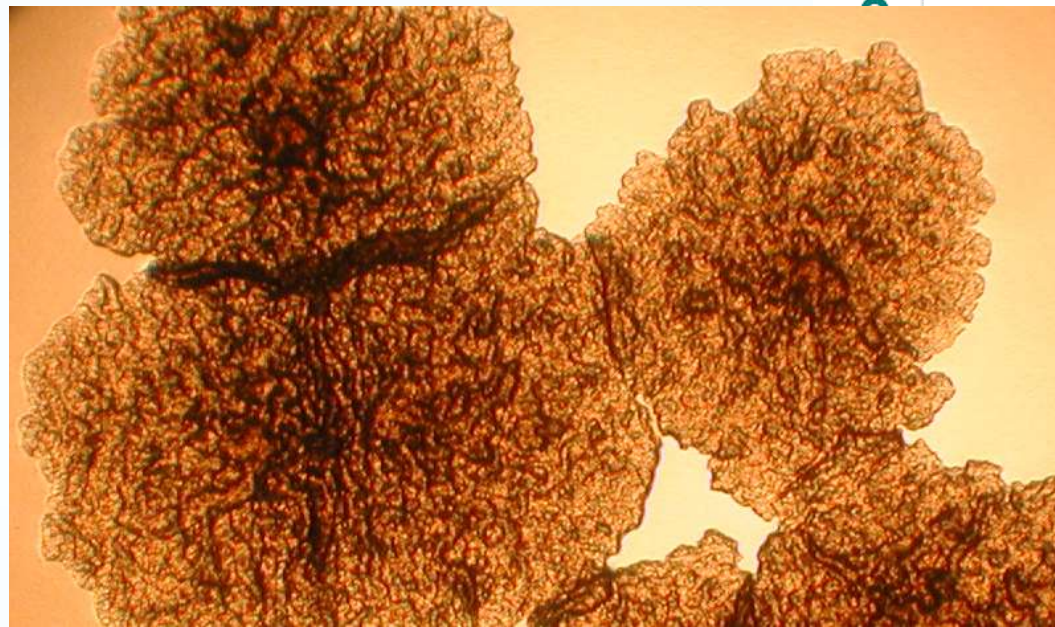


# METODOS PARA IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS

- Fenotípicos
  - Velocidad crecimiento
  - Fotorreactividad
  - Niacina
  - Morfología de la colonia
  - Expresión antígeno MPT64
- Moleculares



# Morfología de la colonia



# Detección de antígeno MPT64

Método inmunocromatograficos (lateral flow)

Ac. monoclonales contra antígeno MPT64

Medio solido o líquido

*M. tuberculosis* y algunos *M. bovis*

En Chile

- MGIT TBc ID BD
- TB Ag MPT64 SD



# Métodos genéticos para identificación de micobacterias

- Hibridación mediante sondas genéticas
  - **AccuProbe MYCO Gene Probe**
    - *M. tuberculosis* complex
    - *M. avium* complex
    - *M. kansasii*
    - *M. gordonae*
- PCR
- Análisis cromatográfico HPLC
- Secuenciación



# PCR mediante tecnología de DNA en tira

*Speed-Oligo® Mycobacteria*

*12 especies*

*M. tuberculosis complex (M. tuberculosis, M. bovis, M. microti, M. africanum),*

*M. avium-intracellulare-scrofulaceum*

*M. chelonae-abscessus,*

*M. kansasii,*

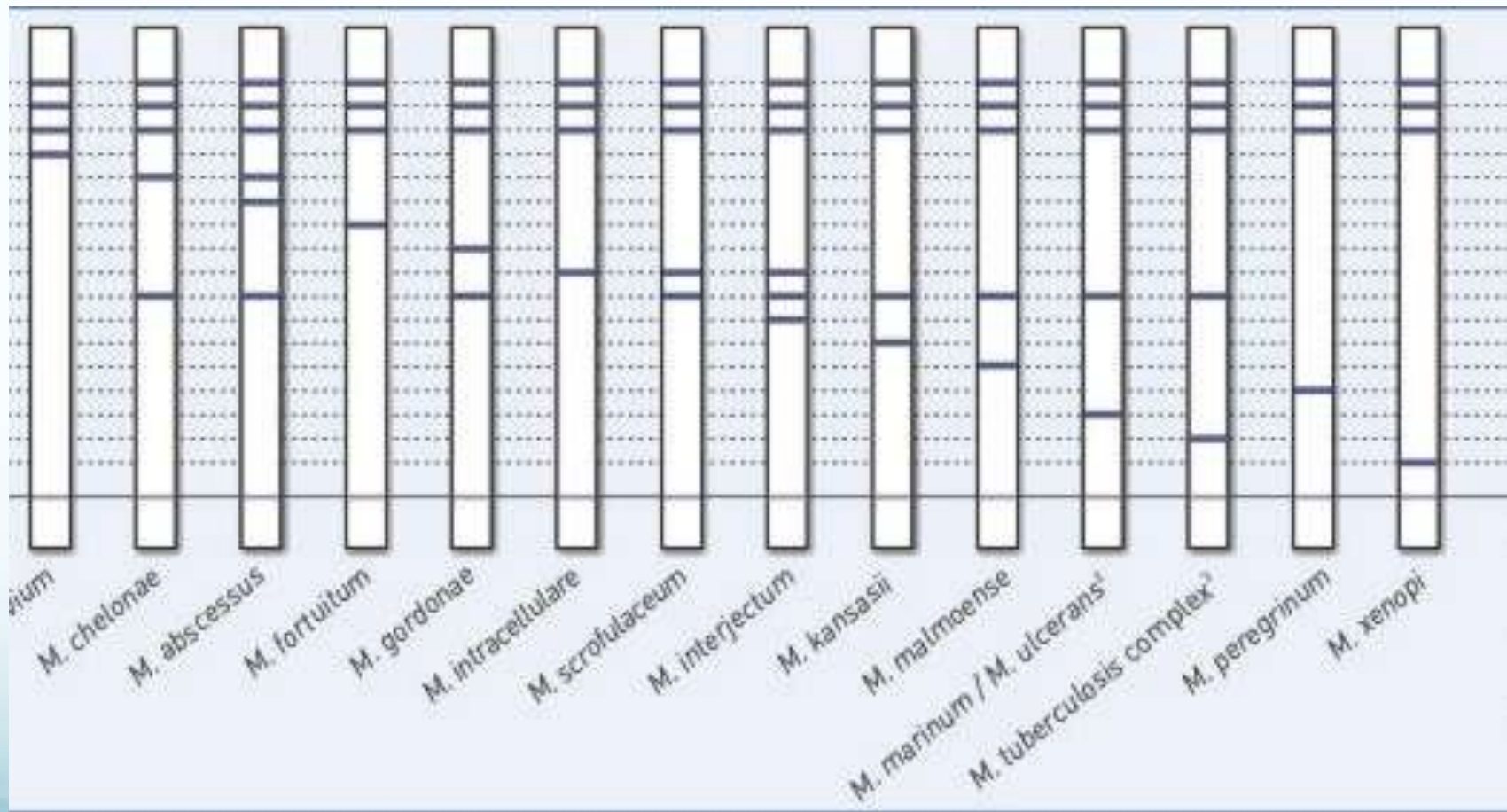
*M. fortuitum*

*M. goodii.*

# PCR mediante tecnología de DNA en tira



# GenoType Mycobacterium CM (GTM-CM) assay (Hain Lifescience, Nehren, Germany)



The GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM permits the simultaneous molecular genetic identification of the *M. tuberculosis complex* and 14 of the most common NTM species

# Tiempo de respuesta en estudio de Micobacterias

- Cultivo tradicional:
  - De L a J 3 a 5 semanas
- Identificación bioquímica
  - 2-3 semanas adicional
- Estudio susceptibilidad en agar
  - 2-3 semanas adicional
- Cultivo automatizado:
  - 3 días a 3 semanas
- Identificación mediante sonda genética:
  - 1 a 2 días
- Susceptibilidad en medio automatizado:
  - 5 días adicionales

PCR para detección e identificación 1-2 días



# Control de tuberculosis

## Fase 1 Control Enfermedad

- Epidemiológico: Cortar cadena transmisión
- Individual: Terapia

## Fase 2 Control Infección

- Epidemiológico: Erradicación de potencial reservorio futuro
- Individual: Prevenir la enfermedad por reactivación endógena

# Infección tuberculosa

- Definición: Presencia de *M. tuberculosis* en ausencia de síntomas ni de evidencia radiográficas de enfermedad tuberculosa
- Detección dirigida a
  - Pacientes en riesgo de infección reciente
  - Pacientes en riesgo de reactivación de infección latente
- Propósito: Terapia

# Detección de infección tuberculosa

Test cutáneo: PPD

Evoca respuesta de hipersensibilidad retardada en personas con infección por *M. tuberculosis*

Test en sangre

Mide la liberación de  $\gamma$ -interferón como respuesta a estímulo con antígenos específicos de *M. tuberculosis*.

# Test cutáneo con PPD

- Mide la respuesta de hipersensibilidad a un derivado de proteína (antígenos crudos compartidos por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, cepa BCG y por otras micobacterias no tuberculosas )
- Inoculación intradérmica de 2 U de RT23
- No permite discriminar entre enfermedad e infección latente.

# Técnica de PPD

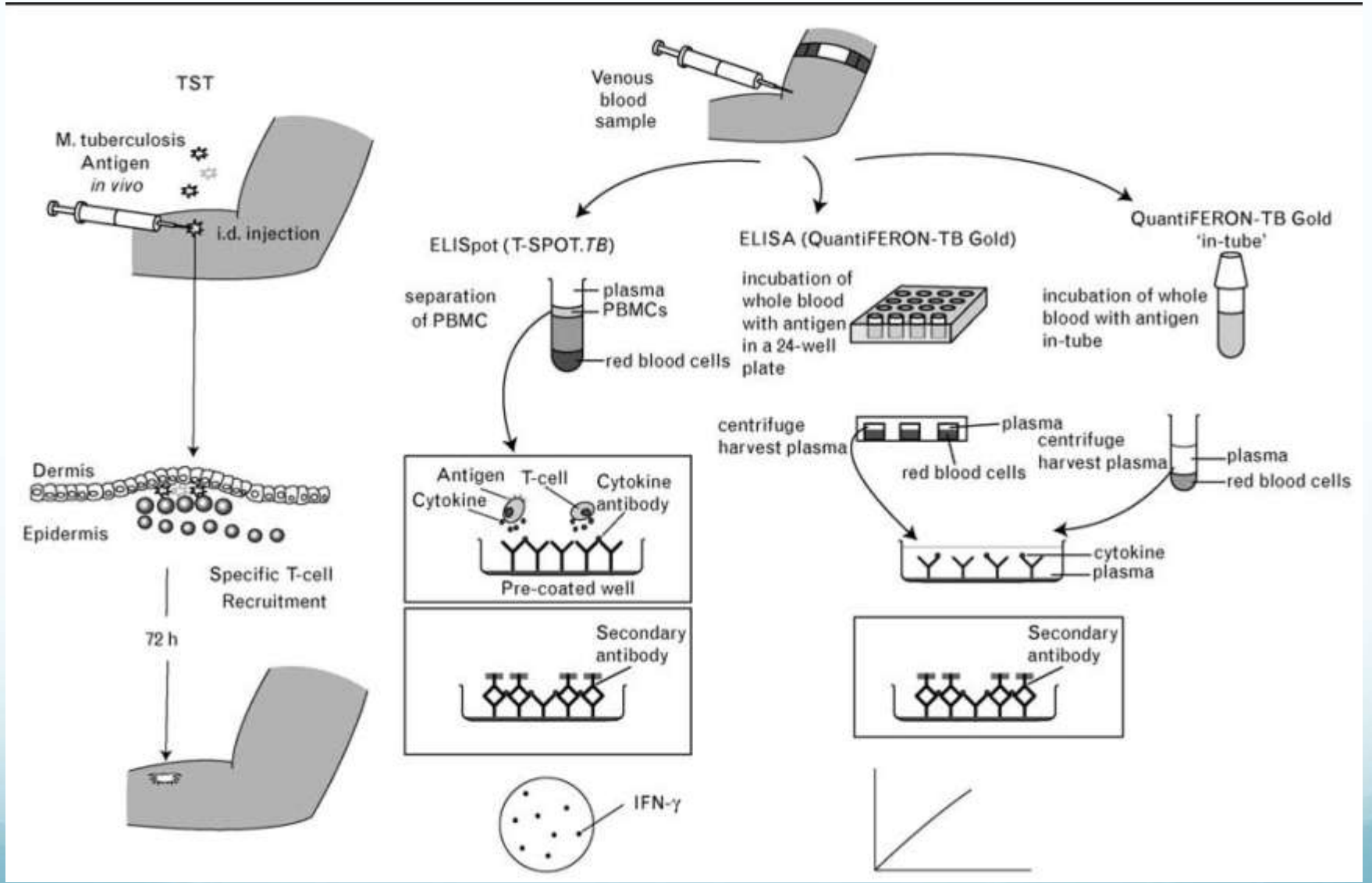


# Evaluación in vitro de liberación de $\gamma$ -INF

- Muestras deben ser procesadas dentro de las 12 horas. de extraída la sangre
- Utilización de antígenos de expresión precoz de *M. tuberculosis*
- Proteínas secretadas de bajo peso molecular (ESAT-6 y CFP-10)
- Antígenos no compartidos con *M. bovis*, BCG y otras micobacteria no tuberculosis excepto *M.kansasii*, *M. szulgai*, *M.flavescens*, y *M. marinum* .

# Antígenos utilizados en test ex vivo

- Proteínas ESAT-6 y CFP-10 :
  - Test comerciales
    - QuantiFERON-TB [Cellestis Limited, Victoria, Australia]
    - T SPOT-TB [Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom]
  - No distingue tuberculosis activa de infección latente.
  - Sensibilidad para tuberculosis activa 74%
  - Nivel cae luego de 3 meses de terapia efectiva





# Elispot

CONTROL  
NULO

ESAT-6

CFP-10

CONTROL  
POSITIVO



Muestra reactiva



Muestra no reactiva



# Gracias

---