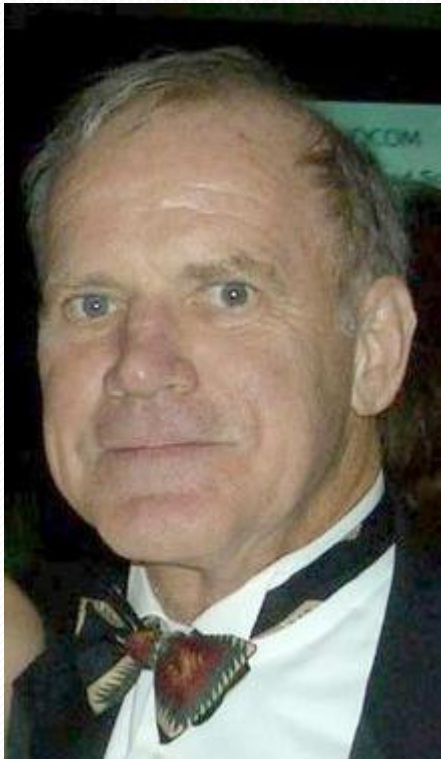


XXVIII SEMINARIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Diagnóstico Molecular de las Infecciones

Roberto Alonso Fernández
Serv. de Microbiología y Enfermedades Infecciosas
Hosp. General Universitario “Gregorio Marañón”
Madrid

Un poco de historia ...



Kary Mullis

- Bioquímico (1944, N. Carolina, USA)
- Inventor de la PCR
- Premio Nobel Química 1993
- *Cetus Co.*
 - Compra patente (10.000 \$)
 - Vende patente a *Roche Molecular Systems* (300.000.000 \$)
- Personalidad peculiar y polémica (“Disidente del SIDA”, anti-ecologista, ...)

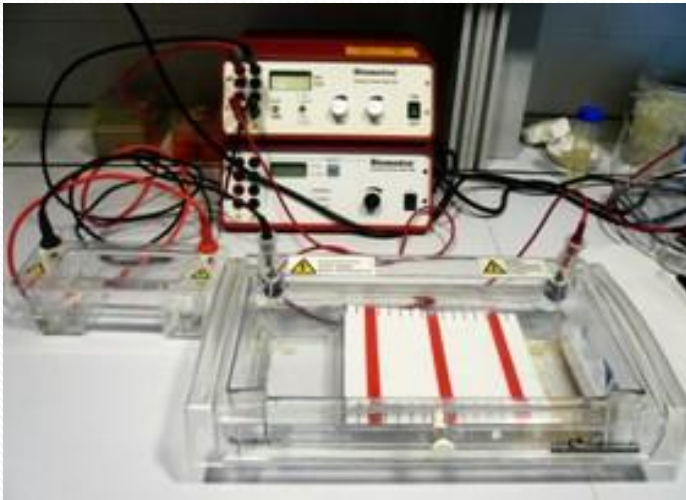
Polimerase Chain Reaction

- Sistema de amplificación de secuencias de DNA
- Inicialmente rudimentaria
 - Polimerasa: *E. coli* ⇒ *Thermus aquaticus*
 - Baños termostatzados ⇒ termocicladores
 - Complejas Instalaciones ⇒ sistemas mejorados ⇒ automatización total
- Investigación básica ⇒ aplicada ⇒ diagnóstico médico (genética humana, bioquímica, inmunología, hematología, enfermedades infecciosas, ...)

Polimerase Chain Reaction



PE 9600



Sistemas de extracción



EZ1



Magnapure



EasyMag

Amplificación/Detección



MX3000



Rotor Gene



Cobas TaqMan



LightCycler

Automatización total



kPCR



QIASymphony



m2000



Panther

Automatización total

B. anthracis

GRIPPE

enterovirus

C. difficile



MRSA

SCB

MTB/RIF

vana

Polimerase Chain Reaction

- Utilidad:
 - Detección, cuantificación y caracterización
 - Diagnóstico, pronóstico y tratamiento (implementación y seguimiento)
- Tipos: Tiempo final / tiempo real, RT-PCR, Nested-PCR, Q-PCR, Multiplex-PCR ...
- Imprescindible para otras técnicas: hibridación (biochips, microarrays), secuenciación ...
- Ha inspirado a otras técnicas: NASBA, TMA, SDA, Q- β -replicasa, LCR...
- Otros sistemas: Hibridación directa, HCS, branched-DNA ...

NATs (Nucleic Acid Tests)

- Alta sensibilidad y Especificidad
- Rápidos
- “Sencillos y Económicos”
- Simplificación situaciones complejas
 - Microorganismos no cultivables
 - De cultivo difícil
 - De cultivo muy lento
 - Cuantificaciones muy precisas
 - Caracterizaciones de fenotipo a través del genotipo



HCV

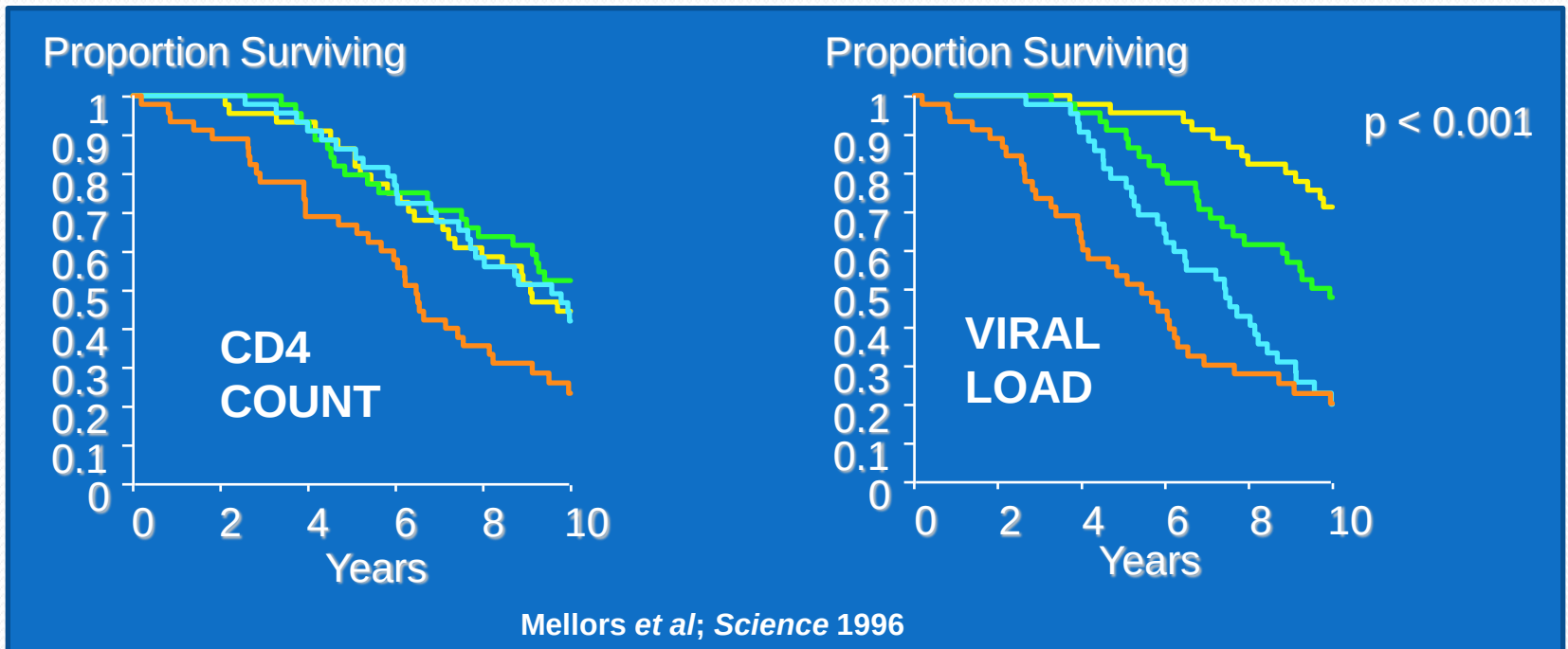


- Uno de los primeros focos de interés. 1990s
 - No cultivable
 - Serología limitada (Anti HCV core)
- Primeros ensayos comerciales
 - Amplicor/Monitor
 - Cobas-Amplicor/Monitor
- Grandes desarrollos: Cuantificación y Genotipado
- Desarrollos paralelos para HBV

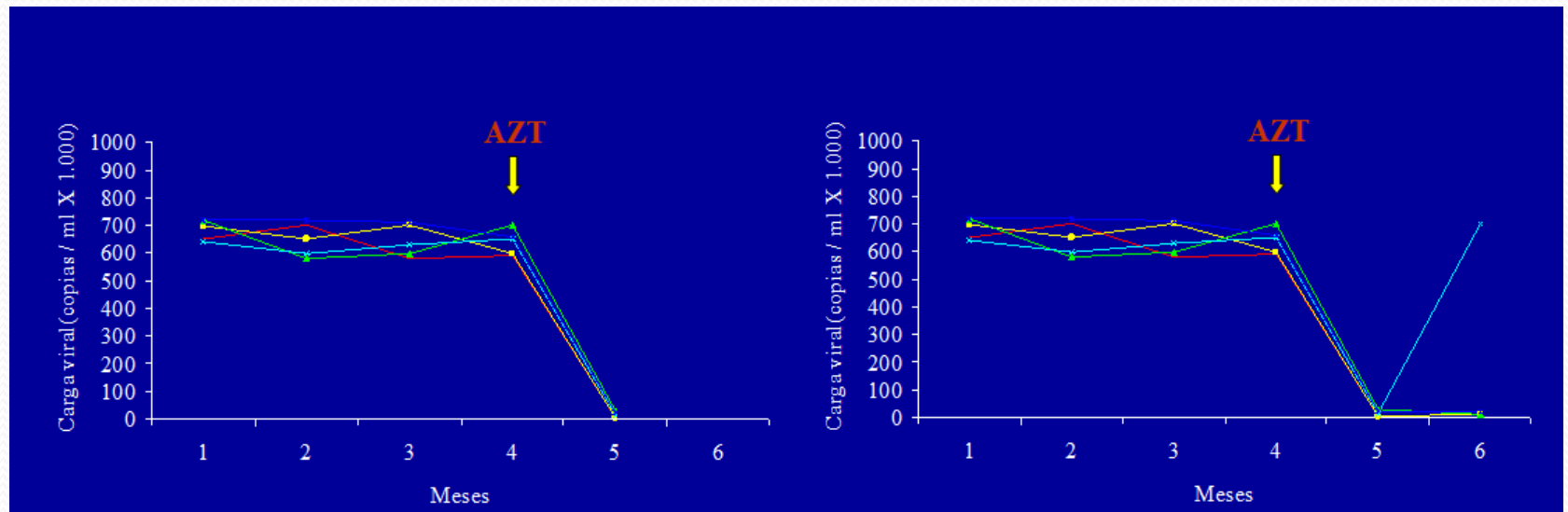


HIV

- Gran revolución mediados de los 90s: nuevos tratamientos y técnicas diagnósticas: **Carga Viral** (RT-PCR, bDNA, NASBA)



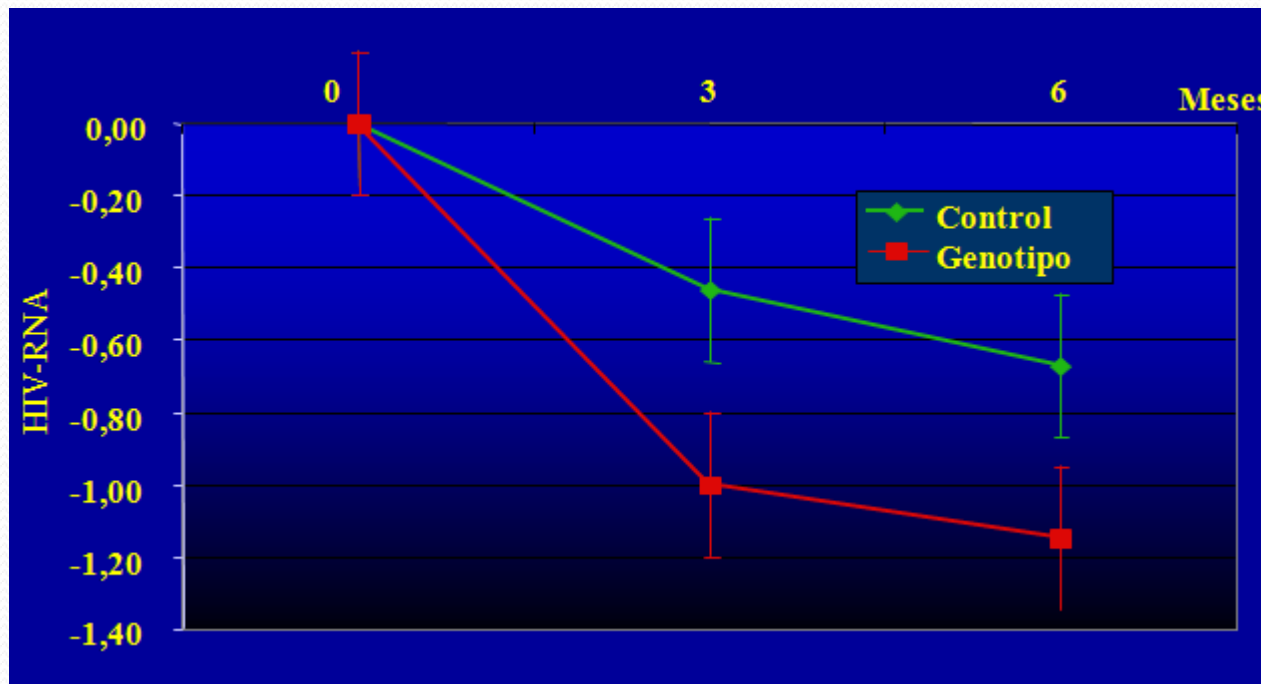
HIV



- Actualidad (gran oferta):
 - Gran automatización
 - Alta sensibilidad analítica (por debajo de 40 copias/ml).
 - Cobertura todas las variantes virales.

HIV

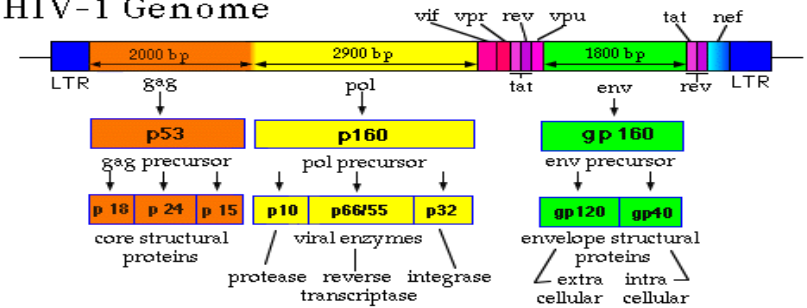
- Segunda gran revolución principios de 2000s:
Genotipo de Resistencias RT-AN y RT-NAN e IP (Inno-Lipa, TruGene, ViroSeq)



Estudio GART (1999); Estudio VIRADAPT (2000)

HIV

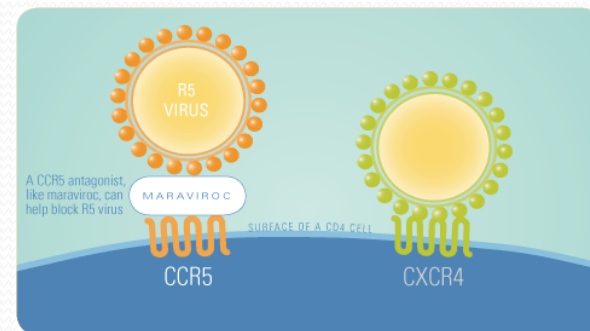
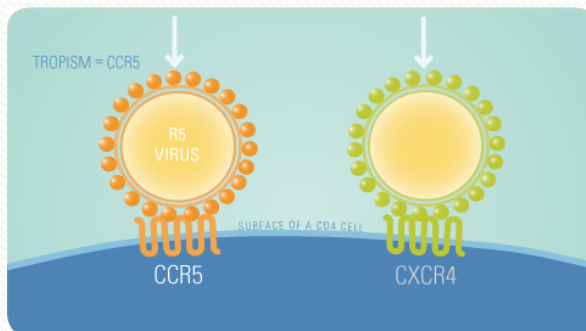
HIV-1 Genome



ccz/95

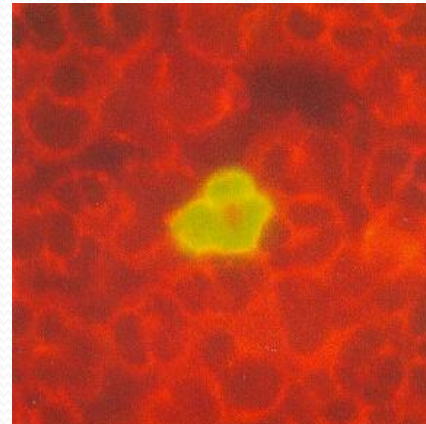
- Otros tests:

- Resistencia inhibidores de fusión (Enfuvirtide)
- Resistencia Inhibidores de la Integrasa (Raltegravir)
- HLA B5701 (Abacavir)
- Ensayos de Tropismo viral (Maraviroc)



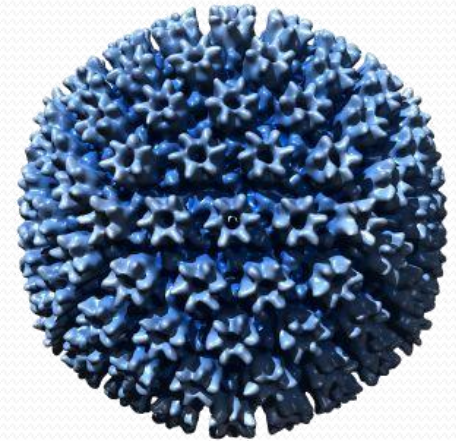
CMV

- Infecciones generalmente subclínicas o autolimitadas (seroprevalencia >75%)
- Grave problema en inmunocomprometidos (infección o reactivación), especialmente receptores de transplantes.
- Viremia correlaciona con la enfermedad y con tratamiento
- Antigenemia



CMV

- PCR cuantitativa:
 - Objetividad
 - Menos laboriosa
 - No depende de recuento leucocitario
 - Mayor sensibilidad: predictor más precoz
- Principales sistemas: Roche, Affigene, Abbott, Qiagen



Infecciones virales del SNC

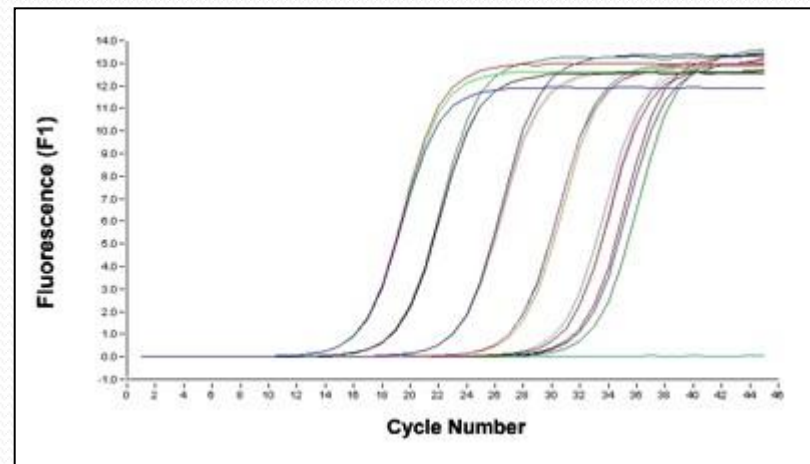
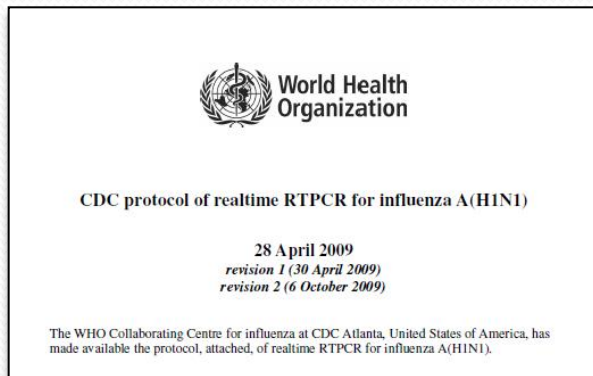
- Meningitis/Encefalitis
- Limitaciones de otras técnicas (ej. Cultivo)
- Muy conveniente el diagnóstico etiológico, especialmente si hay tratamiento
- Principales etiologías:
 - Enterovirus (Gene Xpert)
 - HSV1 + HSV2 (Affigene, Qiagen)
 - Pan – herpesvirus (HSV, CMV, EBV, VZV, HHV-6)
 - Poliomavirus: JC/BK (Argene, Qiagen)
 - HIV (Siemens, Roche)



ITR

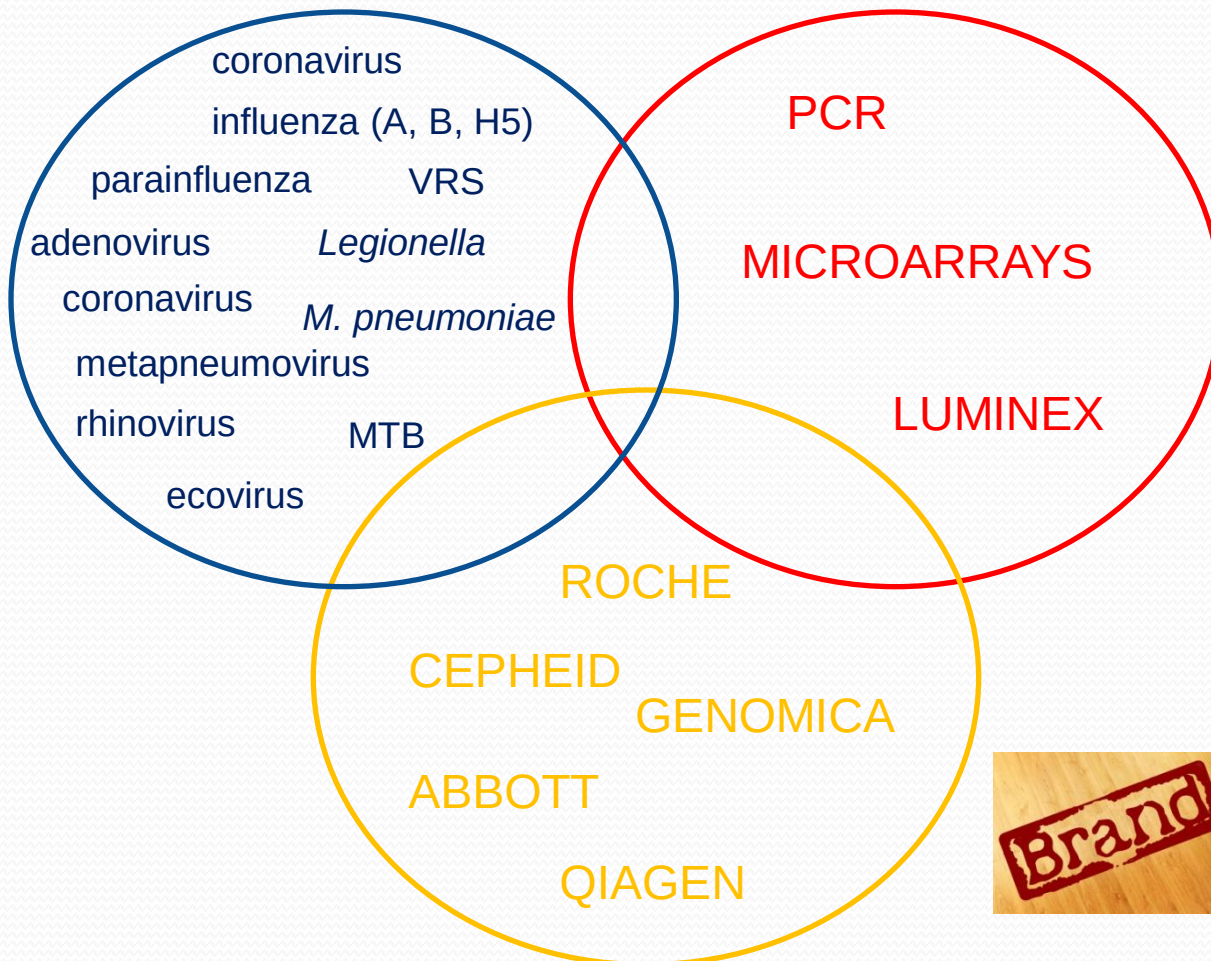


- Pandemia de gripe A (H1N1) 2009-2010
 - Alerta mundial: Alta capacidad dispersión, aunque baja mortalidad (18.000 muertes)
 - Gran implementación técnicas de diagnóstico



ITR

- Otros microorganismos, otros sistemas. **Multiplex**



ETS: *Chlamydia trachomatis*

- Difícilmente cultivable. Otros métodos muy limitados (ej. IFD, IFI, tests rápidos)
- Detección en distintas muestras (incluso orina)
- Diferentes aproximaciones:
 - Gene-Probe PACE 2 CT: hibridación sondas QL-DNA frente a rRNA
 - Qiagen : artus (PCR tr) y Captura de híbridos (HC2)
 - Becton Dickinson: SDA
 - Gene Probe (APTIMA): TMA
 - Roche (Cobas Amplicor): PCR
 - Siemens (kPCR)/Abbott: PCR tiempo real

ETS: HPV

- Causante de cáncer cérvix. 2.000 casos, 700 muertes/año en España.
- No cultivable
- **QIAGEN**: digene HC2 High-Risk HPV DNA Test (gran experiencia, FDA)
 - Pap+HC2 / Cribado con HC2
 - Sondas + Ab conjugados con PA + Sustrato QL
 - Máxima “Sensibilidad clínica”
- Otros sistemas: **Roche** (PCR tiempo real), **Hologic** (Cervista), Gen-Probe APTIMA (TMA), Genómica (PCR + Array), Abbott (PCR tiempo real)

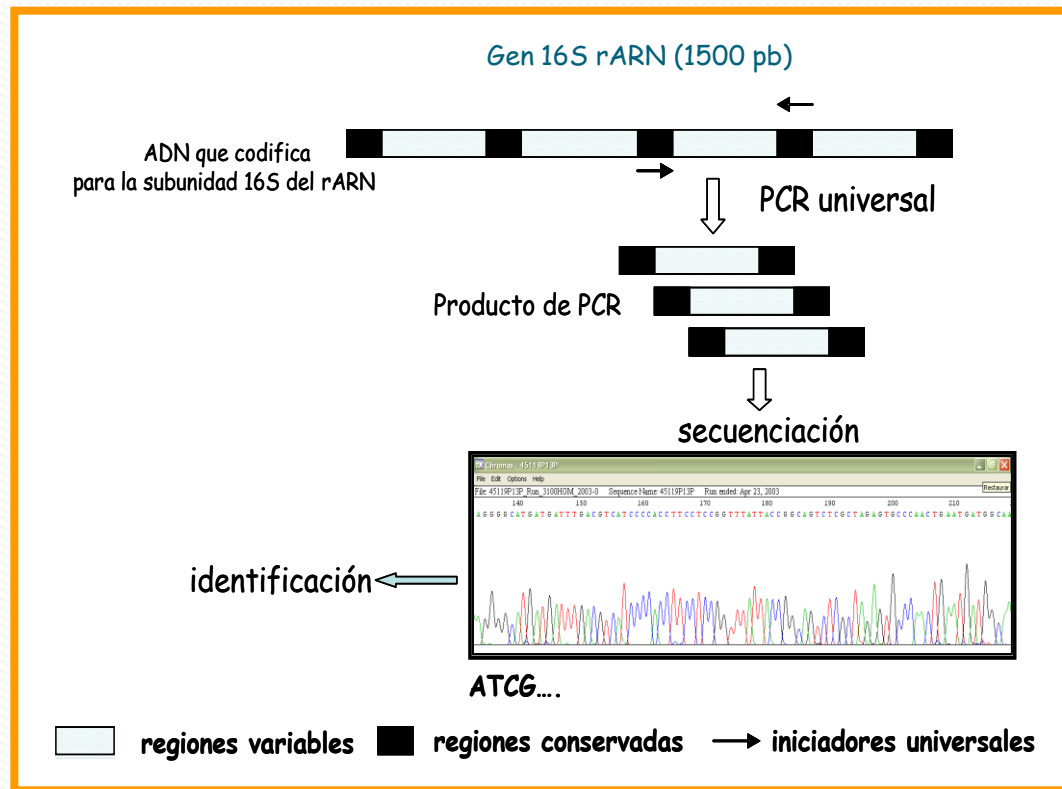
ETS: Otros microorganismos

- *Neisseria Gonorrhoeae* (Gen-Probe, Qiagen, Roche, Siemens, Abbott, BD)
- *Gardnerella vaginalis* (BD)
- *Trichomonas vaginalis* (BD)
- *Candida spp.* (BD)
- SGB (BD, Cepheid Gene Xpert)



Det. bacteriana universal

- Secuenciación Genes rRNA (16S y 23S)



Det. bacteriana universal



- Identificación bacteriana.
- Detección bacteriana en muestras ordinariamente estériles: Ej. Diagnóstico de la Endocarditis Infecciosa.
 - Imagen + crecimiento bacteriano en HC y/o tejido
 - 2-30% HC negativo (especialmente con atb previo)

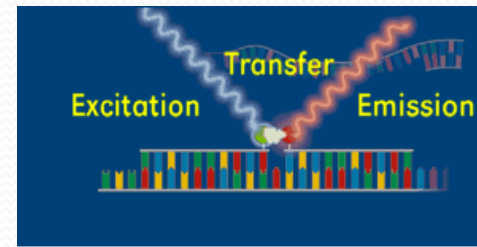
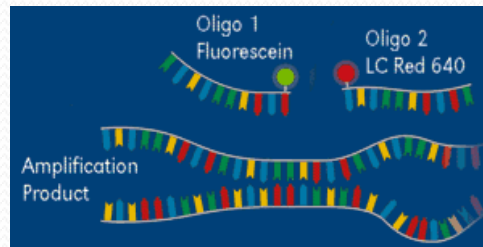
	Sens %	Espec %	VPN %	VPP %
PCR 16S rARN y secuenciación	96	95,3	98,4	88,5
Cultivo de válvulas cardiacas	24,3	56,4	73,8	12,8

Marín et al. **Medicine**. 2007. 86 (4).

Sepsis



- Rapidez (4-6 horas) / Sepsis con HC neg.
- Septifast (Roche):
 - PCR universal (16S-23S/18S-28S)
 - Hibridación con sondas FRET



Gram (-)	Gram (+)	Fungi
• <i>Escherichia coli</i> • <i>Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)</i> • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Enterobacter (cloacae / aerogenes)</i> • <i>Proteus mirabilis</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Acinetobacter baumannii</i> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	• <i>Staphylococcus aureus</i> • CoNS (Coagulase negative <i>Staphylococci</i>) • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Streptococcus spp.</i> • <i>Enterococcus faecium</i> • <i>Enterococcus faecalis</i>	• <i>Candida albicans</i> • <i>Candida tropicalis</i> • <i>Candida parapsilosis</i> • <i>Candida krusei</i> • <i>Candida glabrata</i> • <i>Aspergillus fumigatus</i>

Sepsis

- Otros sistemas
 - Verigene (Nanosphere)
 - Sepsitest (Molzym)

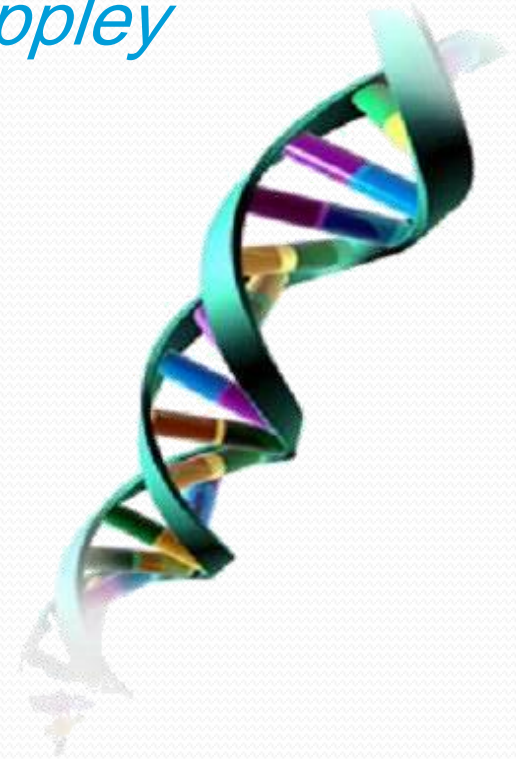


Genus	Species	Resistance	Genus	Species	Resistance
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecA</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KPC
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>vanA</i>	<i>Proteus</i> spp.	<i>Citrobacter freundii</i> complex	NDM-1
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>vanB</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Citrobacter koseri</i>	
<i>Listeria</i> spp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Stenotrophomonas</i> spp.	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	
	<i>Streptococcus anginosus</i> Group			<i>Enterobacter aerogenes</i>	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>			<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>			<i>Haemophilus influenzae</i>	
	<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	<i>Enterococcus faecium</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>	
				<i>Neisseria meningitidis</i>	
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
				<i>Serratia marcescens</i>	

Bacterias no cultivables



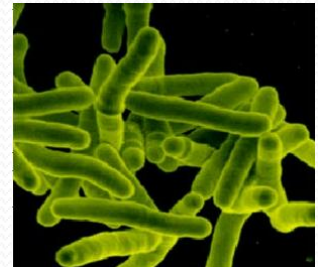
- *Tropheryma whippelii*
- *Coxiella*
- *Bordetella*
- *Bartonella*
- *Rickettsia*
- *Mycoplasma*
- *Chlamydia*
- ...



¡Las PCRs específicas son también más sensibles !

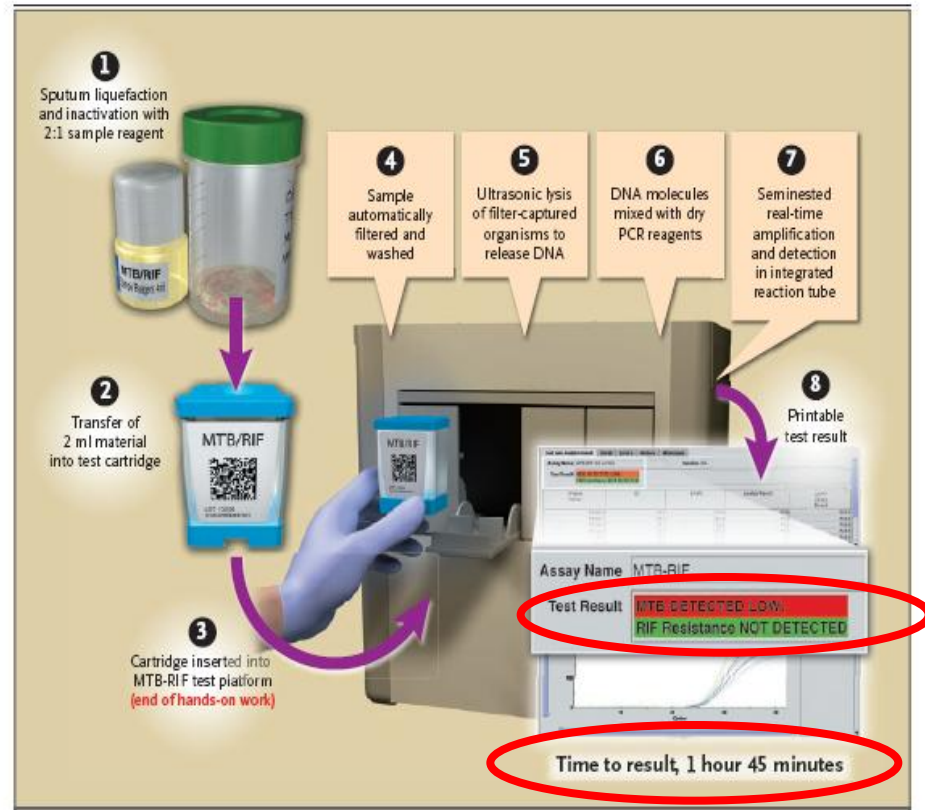
Micobacterias

- Tuberculosis: uno de los principales problemas de salud en el mundo.
- Baciloscopia: baja sensibilidad; Cultivo: lento (2-6 s)
- Diagnóstico / Identificación / Detección de resistencias
- Distintas aproximaciones:
 - Hibridaciones: AccuProbe (Gen-Probe), GenoType (Hain), InnoLipa (Innogenetics)
 - PCR: Cobas TaqMan (Roche), LightCycler MTB (Roche), Xpert (Cepheid), artus (Qiagen)
 - TMA: Amplified MTD (Gen-Probe)
 - SDA: ProbeTec (Beckton Dickinson)



Micobacterias

- “Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance”. Boheme C.C. *et al. NEJM*. 2010
- 1.730 pacientes con sospecha de T.P. (Perú, Azerbaiyán, Sudáfrica e India).
- Xpert vs. baciloscopia Cultivo y SQ.
- Especificidad: 98%
- Sensibilidad:
 - A+: 98,2%
 - A-: 72%/85%/90%



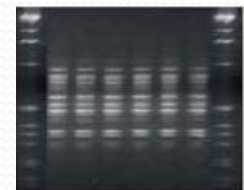
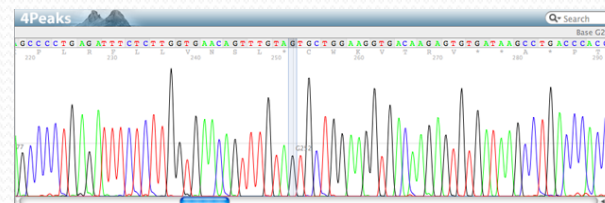
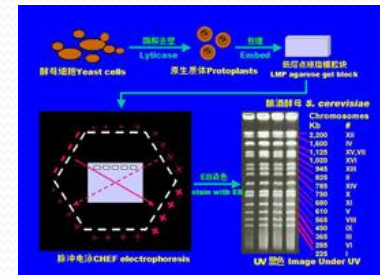
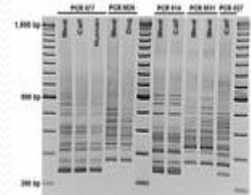
Genes de Resistencia

- Métodos tradicionales lentos y poco sensibles
- Pocos métodos comerciales. La mayoría “home brew”
- Algunos ejemplos:
 - Resistencia a Meticilina en *S. aureus* (Xpert)
 - Resistencia a Vancomicina en *E. faecalis* (Xpert)
 - Resistencia a Rifampicina en *M. tuberculosis* (Xpert)
 - Resistencia a β -lactamasas
 - Resistencia a antirretrovirales (TruGene, MicroSeq)
 - Resistencia a Tamiflu (Oseltamivir)



Tipación microbiana

- Caracterización a nivel de cepa
 - Detección de brotes; Control de la infección; Recidivas *vs.* reinfecciones; Infecciones monoclonales *vs.* policlonales
 - Diferentes aproximaciones
 - Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)
 - Ribotipación
 - Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)
 - Basados en PCR
 - PCR-Ribotipación
 - Random Amplification of Polymorphic DNAs (RAPDs)
 - rep-PCR
 - Secuenciación
-
-
-
-



Tipación microbiana

- Diversilab™ (BioMerieux)
 - Extracción
 - Rep-PCR (Fingerprinting kits)
 - Separación (microfluidics DNA LabChip)
 - Lectura + Análisis (via Web)

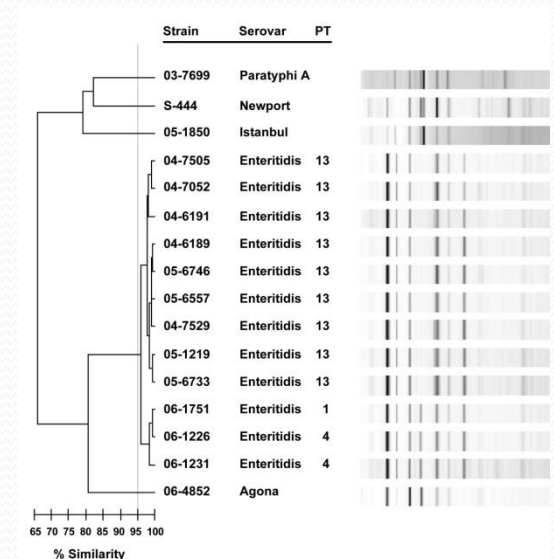
DIVERSILAB DNA FINGERPRINTING KITS

Genus-specific Fingerprinting Kits:

<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Mycoplasm</i>
<i>Archaea</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Bordetella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Serratia</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Legionella</i>	<i>Shigella</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Listeria</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Candida</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Clostridium</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Streptococcus</i>

General Fingerprinting Kits:

Mold Kit	TCQC Kit
Yeast Kit	Non-Fermenter Kit



NUEVAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN

- Next generation SQ / UD-SQ / High Throughput-SQ
- 600 bp → 1000.000.000 bp (1Gb)
- 1 gen → 1 genoma
- Gran capacidad, velocidad y sensibilidad.
Económicos



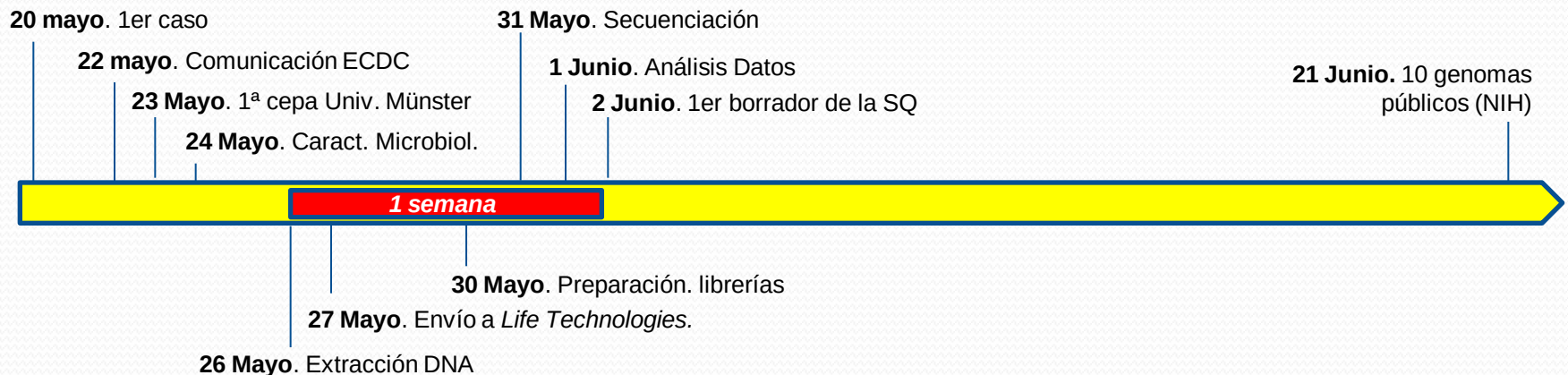
NUEVAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN



ó



- Gran brote de GEA (3.816 casos) +/- SHU (845 casos). Mayo-julio. Alemania (54 muertes).



- *Escherichia coli* O104:H4 enteroagregativa/enterohemorrágica / productora de BLEEs (MDR)

"Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany". Frank et al. *NEJM*. 26 Oct. 2011.

"German Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Associated with Sprouts". Buchholz et al. *NEJM*. 26 Oct. 2011.

Muchas gracias

