

NUEVOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS

Fernando Alcaide Fernández de Vega

Servicio de Microbiología, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

En los últimos años se ha asistido, en los países desarrollados, a un aumento del aislamiento de numerosas especies micobacterianas. Aunque *Mycobacterium tuberculosis* es, con mucho, la micobacteria más importante y más frecuentemente aislada, las micobacterias no tuberculosas (MNT) representan, en la actualidad, entre el 10% y el 30% del total aisladas en la mayoría de los laboratorios de Microbiología. Además, un gran número de ellas son patógenas para el hombre. Por ello, ante cualquier aislamiento micobacteriano clínico, se recomienda llevar a cabo una identificación de especie. En la identificación del género *Mycobacterium* existen diversos tipos de abordaje metodológico: convencional o fenotípico, cromatográfico, y los nuevos métodos, como son el fagotípico, y el genotípico o molecular.

Los métodos tradicionales se basan en una identificación preliminar mediante el tiempo de crecimiento (lento o rápido), los aspectos morfológicos y de cromogenicidad o producción de pigmento de las colonias (fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas). Posteriormente, se llevan a cabo diferentes pruebas bioquímicas para llegar a una identificación específica. Sin embargo, la laboriosidad de los métodos fenotípicos y el crecimiento lento de estas bacterias demoran la identificación definitiva varias semanas siendo, en muchos casos, imposible realizar la identificación de la especie.

En el presente artículo se revisan las nuevas alternativas para la identificación de las micobacterias. Aunque es posible realizar algunas de ellas directamente sobre las muestras clínicas, esta revisión hace hincapié en la aplicación sobre cultivos, ya que la identificación sobre muestra ha sido motivo de otros manuscritos en el Boletín de Control de Calidad SEIMC y, además, su aplicación práctica es motivo de controversia no del todo resuelta.

IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

Una alternativa es el análisis lipídico de estos microorganismos mediante diversos estudios cromatográficos: cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases/espectrometría de masas. De todas ellas, el estudio de los ácidos micólicos mediante HPLC ha demostrado ser rápido, reproducible, específico de especie y de aplicación universal en la identificación micobacteriana. No obstante, al igual que el resto de técnicas cromatográficas, no deja de ser un método complejo que requiere una infraestructura costosa y un gran entrenamiento, constituyendo una alternativa útil de identificación sólo en aquellos centros con la dotación y experiencia suficientes.

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE FAGOS ESPECÍFICOS

Dentro de los nuevos métodos de identificación ha aparecido, recientemente, la aplicación de bacteriofagos con afinidad específica por las micobacterias. Desde 1947 se han descrito más de 250 micobacteriófagos. No obstante, tan sólo dos métodos, el LRP (*Luciferase Reporter Phage*) y el *FASTPlaqueTB*® (Biotech Laboratories Ltd., Ipswich, Reino Unido) o *PhageTeK*® MB (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) han demostrado tener cierta utilidad clínica. Estos métodos se diferencian básicamente en la detección de las células micobacterianas infectadas por el fago. En el LRP se utiliza la emisión de luz que es

codificada por el gen de la luciferasa, el cual se encuentra incorporado en el genoma del fago. Esta enzima es un indicador de la presencia de células micobacterianas viables. En el *FASTPlaqueTB*[®] o *PhageTeK*[®] MB, la detección se basa, tan sólo, en la presencia de múltiples células micobacterianas infectadas viables tras una amplificación fágica (mycobacteriofago D29) en *Mycobacterium smegmatis*.

El LRP ha demostrado ser útil en la diferenciación entre *M. tuberculosis* y las MNT a partir de cultivo y en las pruebas de sensibilidad a la isoniazida y rifampicina. El *FASTPlaqueTB*[®] o *PhageTeK*[®] MB son productos comerciales para el diagnóstico de la tuberculosis en muestras respiratorias, así como para la realización de pruebas de sensibilidad a la rifampicina en aquel microorganismo. En general, se trata de técnicas sencillas que requieren poco entrenamiento técnico, rápidas (48 h) y relativamente económicas. Sin embargo, se deben tener en cuenta los diversos problemas de sensibilidad y especificidad observados en los escasos estudios realizados. Por ello, una posible aplicación de estos métodos en laboratorios con recursos limitados, especialmente en países en desarrollo, debería reservarse a los pacientes con baciloscopia negativa y siempre con una elevada sospecha clínica de padecer tuberculosis.

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

En la actualidad, la identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una precisa y rápida identificación de las especies micobacterianas. Sus principales ventajas son: una aplicación universal sobre todos los aislamientos, la posible detección rápida (directamente de las muestras o de cultivos recientes), la identificación de microorganismos de difícil cultivo, el reconocimiento preliminar de nuevos taxones micobacterianos, la reducción del riesgo biológico derivado de la manipulación de los cultivos, y una adecuada relación coste-beneficio en los laboratorios clínicos de nivel III o de referencia. Por el contrario, aparte de las contaminaciones potenciales y las limitaciones de su empleo directo sobre muestras clínicas, estas técnicas no pueden actualmente sustituir completamente a la metodología tradicional. Por otro lado, su comercialización está relativamente poco desarrollada y algunas de estas técnicas, como la secuenciación, requieren una inversión inicial elevada. Esta visión negativa puede ser matizada, ya que existe en la actualidad una gran variedad de técnicas con diferentes niveles de aplicación, algunas de las cuales pueden ser perfectamente instauradas en los laboratorios diagnósticos con un desembolso inicial asumible, un escaso mantenimiento y un rendimiento óptimo.

Sondas de ácidos nucleicos

En la última década han aparecido sondas comerciales de DNA (*AccuProbe*[®], *GenProbe* Inc., San Diego, Estados Unidos) no radiactivas que permiten identificar por hibridación con el RNA ribosómico micobacteriano, de forma rápida (2 h) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, el grupo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium goodnae*. Estas sondas se pueden aplicar sobre los cultivos obtenidos tanto en medios sólidos como líquidos. Así mismo, ofrecen la posibilidad de utilizarlos en medios líquidos con contenido hemático, siendo necesario una pequeña preparación previa mediante concentración y lavado con una solución detergente (dodecil sulfato sódico y EDTA).

Las sondas comerciales han sufrido, a lo largo de los años, diferentes reformulaciones debido a diversos problemas de sensibilidad y especificidad pero, en la actualidad, constituyen uno de los modelos de referencia en la detección e identificación micobacteriana clínica habitual, en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados. Sin embargo, su aplicación queda limitada a un grupo de micobacterias que, si bien es el más importante desde el punto de vista clínico, no deja de ser reducido. Además, requiere una orientación presuntiva para la elección de la sonda correspondiente, al poder tan solo realizar una identificación por

prueba. Esta selección puede realizarse de una forma sencilla mediante una tinción de Ziehl-Neelsen directa del cultivo. También es importante no olvidar la posibilidad de encontrarnos ante cultivos micobacterianos mixtos, especialmente en los pacientes inmunodeprimidos. Esta circunstancia obliga a realizar un subcultivo, a pesar de una identificación positiva con la sonda de DNA para el grupo *M. avium-intracellulare* o *M. tuberculosis*, principalmente.

Amplificación de secuencias de DNA específicas

Este grupo de técnicas requiere la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro sistema, de una zona de DNA concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos o de un posterior análisis postamplificación mediante restricción, hibridación o secuenciación. Como en toda técnica de amplificación, hay diversos factores que influyen sobre el rendimiento final de ésta y que se relacionan a continuación.

- a) **Elección de la secuencia diana a amplificar.** En las micobacterias existen regiones bien conservadas del DNA específicas de género, que flanquean regiones hipervariables específicas de especie. En la actualidad las dianas mejor estudiadas son el gen *hsp65* que codifica la proteína micobacteriana de 65 KDa (*heat shock*) y regiones genómicas de la subunidad ribosómica 16S. No obstante, existen otras zonas útiles como son la región intergenética 16S-23S ribosomal y los elementos de inserción, entre otras.
- b) **Preparación de la muestra.** Aunque existe la interesante posibilidad de extraer el DNA directamente de la muestra clínica, lo cierto es que las técnicas de amplificación han probado funcionar mejor a partir de cultivos, sólidos o líquidos. En esta situación, la cantidad de DNA disponible es elevada y fácil de obtener, no requiriendo una extracción cuidada y laboriosa, como en el caso del procedimiento de fenol-cloroformo; tan sólo una lisis, en sus diferentes variedades, es suficiente, pudiéndose incorporar en cualquier laboratorio diagnóstico. Los métodos más sencillos y prácticos consistirían en hervir una suspensión de las colonias micobacterianas, durante 20 min, o bien llevar a cabo una rotura mecánica de las células micobacterianas mediante ultrasonidos.
- c) **Amplificación.** Actualmente, esta fase no constituye problema alguno. Un gran número de laboratorios clínicos posee una mínima infraestructura para la realización de técnicas de amplificación por PCR u otros métodos equivalentes y están familiarizados con este tipo de técnicas. Existen en la literatura numerosos artículos en donde se describen las secuencias de cebadores a utilizar, que también pueden ser seleccionadas por cada laboratorio mediante el acceso a bancos de genes (GeneBank) y la ayuda de un *software* específico. Las nuevas generaciones de termocicladores, que utilizan tubos de reacción de pared fina, completan la reacción de amplificación en menos de 2 h. Cuando se realiza la PCR a partir de cultivos, existe una gran cantidad inicial de DNA diana que impide, en gran manera, la contaminación potencial por los productos de amplificación previos, a diferencia de la amplificación diagnóstica directa sobre muestras clínicas, en donde podemos encontrarnos con un bajo número de microorganismos.
- d) **Análisis postamplificación.** Existen diversas posibilidades, como se describe a continuación:
 - *PCR-RFLP (hsp65)*. Esta técnica, basada en la amplificación por PCR del gen *hsp65* y su posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante dos enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*), consigue una identificación rápida, precisa y económica de todas las cepas micobacterianas en los laboratorios clínicos. Aunque existen otras técnicas similares (vg., PCR-RFLP del 16S-23S), ésta es, actualmente, la mejor desarrollada, con una aplicación práctica de indudable valor. A título de ejemplo, se puede obtener el resultado final en la misma jornada laboral.

Además, la experiencia acumulada en diversos centros, con una amplia relación de los polimorfismos encontrados en las distintas cepas analizadas, se encuentra reflejada en una página web (www.hospvd.ch/prasite/), en donde se pueden llevar a cabo y consultar los patrones obtenidos, así como intercambiar experiencias con diversos expertos en dicho método. Gracias a todo ello, se conoce que la técnica es lo suficientemente discriminante para diferenciar las especies y subespecies de los diversos complejos micobacterianos, e incluso dentro de las especies consideradas clásicamente homogéneas y en las que recientemente se ha descrito su heterogeneidad, como en *M. kansasii*.

- **Secuenciación (DNA) de la subunidad ribosomal 16S.** La secuenciación automática con iniciadores marcados con fluoresceína representa un avance sustancial, solucionando la identificación de muchos microorganismos que, por métodos convencionales, es imposible. Esta técnica representa el patrón de referencia de las identificaciones genotípicas, con la mayor base de datos disponible en la actualidad (GenBank/Entrez, <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Aunque existen diversos trabajos que propugnan su aplicación en la práctica diaria, sigue siendo un método caro y laborioso, que quedaría limitado a los laboratorios de referencia. No obstante, los avances tecnológicos son constantes y la mayor automatización con los nuevos secuenciadores capilares o la aparición de *microchips* de secuenciación del DNA podrían suponer una alternativa potencial en el futuro que conviene no perder de vista.
- **Hibridación en fase sólida.** Se trata de una prometedora tecnología en pleno desarrollo, basada en sondas cortas de DNA específicas de especie y presentadas en formatos más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc) y otros de futura aplicación como son los microchips (APEX, Nanogen, Inc./Becton Dickinson Microbiology Systems). En una sola prueba, se aplicaría el producto de amplificación sobre diversas sondas de los microorganismos más frecuentemente aislados y con importancia clínica.

En la actualidad se dispone de dos productos comerciales: INNO-LiPA® Mycobacteria (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) y GenoType® Mykobakterien (Hain Diagnostika, Nehren, Alemania). Ambos métodos, identifican el complejo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium celatum* y *Mycobacterium malmoense*. Además, el nuevo INNO-LiPA® incluye *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium marinum/ulcerans*, *Mycobacterium haemophilum* y *Mycobacterium smegmatis*, mientras que el GenoType® incluye *Mycobacterium peregrinum* y *Mycobacterium phlei*. Ambos sistemas se basan en la amplificación de una zona genética concreta (espacio intergenético 16S-23S para el INNO-LiPA® y el 23S rDNA para el GenoType®). Posteriormente, se realiza la hibridación del producto de amplificación sobre las diferentes sondas dispuestas en una tira de nitrocelulosa, que son de fácil lectura e interpretación. En los pocos estudios realizados se ha observado que ambos sistemas son muy similares, con una buena sensibilidad y especificidad a partir de cultivos líquidos y sólidos, obteniéndose los resultados en 5-6 h. Además de la variedad de especies que pueden identificarse en una sola prueba, otra ventaja de estos métodos es la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Los principales inconvenientes son la laboriosidad y coste de ambos, aunque inicialmente el GenoType® es algo más económico.

- e) **Amplificación y detección a tiempo real.** Más recientemente, se ha comenzado a utilizar, con fines diagnósticos, la tecnología de amplificación y detección en tiempo real. Estos métodos se basan en la realización simultánea de la amplificación de una zona diana concreta y el reconocimiento de ésta mediante hibridación que, a su vez, es

detectada y cuantificada mediante el uso de diversos fluorocromos. Las mayores ventajas residen en su rapidez (3 h) y las posibilidades futuras de aplicación para un amplio abanico de especies, así como la detección e identificación directas a partir de muestras. En la actualidad, existen diversos sistemas de amplificación y marcaje, aunque tan sólo uno está comercializado: BDProbeTec® ET (Becton Dickinson, Sparks, Estados Unidos). Éste se basa en la amplificación por desplazamiento de cadenas de DNA (SDA, *strand displacement amplification*) y posterior detección mediante la transferencia de energía fluorescente (ET). A partir de cultivos, incluye la identificación de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium*, así como *M. kansasii*. Existe, además, la posibilidad de identificar el primero de estos complejos directamente de las muestras respiratorias. En general, tanto el BDProbeTec® ET, como los métodos no comercializados que utilizan los sistemas LightCycler® (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) o ABI Prism 7700® con sondas TaqMan® (PE Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), se encuentran en desarrollo y con los que existe una experiencia escasa. No obstante, los primeros datos son prometedores pudiendo constituir en el futuro una alternativa real en la identificación micobacteriana en la práctica diaria de nuestros laboratorios.

BIBLIOGRAFIA

- BERGMANN JS, KEATING WE, WOODS GL. Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000; 38:863-865.
- KIRSCHNER P, ROSENAU J, SPRINGER B, TESCHNER K, FELDMANN K, BÖTTGER EC. Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. J Clin Microbiol 1996; 34:304-312.
- LACHNIK J, ACKERMANN B, BOHRSEN A, MAASS S, DIEPHAUS C, PUNCKEN A, STERMANN M, BANGE FC. Rapi-Cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 2002; 40:3364-3373.
- MOLE RJ, MASKELL T W. Phage as diagnostic-the use of phage in TB diagnosis. J Chem Technol Biotechnol 2001; 76:683-688.
- PATEL JB, LEONARD DGB, PAN X, MUSSER JM, BERMAN RE, NACHAMKIN I. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 50016S rDNA bacterial identification system. J Clin Microbiol 2000; 38:246-251.
- ROTH A, REISCHL U, STREUBEL A *et al.* Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. J Clin Microbiol 2000; 38:1094-1104.
- RUIZ P, GUTIÉRREZ J, ZEROLO FJ, CASAL M. GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species isolated from human clinical samples by using liquid medium. J Clin Microbiol 2002; 40:3076-3078.
- SPRINGER B, STOCKMAN L, TESCHNER K, ROBERTS GD, BÖTTGER EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular vs. phenotypic methods. J Clin Microbiol 1996; 34:296-303.
- SUFFYS PN, DA SILVA ROCHA A, DE OLIVEIRA M *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level using Inno-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. J Clin Microbiol 2001; 39:4477-4482.
- TAYLOR TB, PATTERSON C, HALE Y, SAFRANEK WW. Routine use of PCR-restriction fragment

length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol 1997; 35:79-85.

TELENTI A, MARCHESI F, BALZ M, BALLY F, BÖTTGER EC, BODMER T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993; 31:175-178.

VERSALOVIC J. DNA chip-based microbiology. Clin Microbiol Newsletter 2001; 23:99-102.