

PROTOCOLO DE USO CLÍNICO DEL PCR EN TIEMPO REAL (GENEXPERT)

La prueba de PCR en Tiempo Real, que se usa con el sistema Cepheid GeneXpert®, es una prueba diagnóstica in vitro de PCR semicuantitativa, integrada y en tiempo real que se utiliza para:

- 1) la detección de compuestos de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de esputo o en sedimentos concentrados preparados a partir de esputos expectorados cuyas extensiones sean tanto positivas como negativas para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).
- 2) la detección de mutaciones asociadas a la resistencia a la rifampicina del gen *rpoB* en muestras de pacientes susceptibles de presentar resistencia a la rifampicina.

Es decir, nos permite la obtención de dos resultados fundamentales que son:

- a) el diagnóstico de **MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**, y
- b) el diagnóstico de **TB RESISTENTE A RIFAMPICINIA**

El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal, un escáner de código de barras y un software para la realización de pruebas con las muestras recogidas y la visualización de resultados. Este sistema requiere el uso de cartuchos Genexpert desechables de un solo uso para los reactivos y el proceso de PCR; dado que los cartuchos son independientes, se elimina el riesgo de contaminación cruzada de muestras.

La naturaleza infecciosa de la TB pulmonar y especialmente la resistente a drogas, convierte en urgente un diagnóstico rápido, preciso e informativo para el tratamiento y control de esta enfermedad.

Según la información de la OMS, la resistencia a RIF no suele darse sola, y frecuentemente va unida a la resistencia a algunos otros fármacos contra la TB. Lo más habitual es encontrarla en cepas resistentes a múltiples fármacos (TB-MDR y DR), en las que aparece con una frecuencia superior al 95%.

La detección molecular de la TB y de las mutaciones genéticas en el gen *rpoB* asociadas a la resistencia a RIFAMPICINA, acelera enormemente el diagnóstico tanto de la resistencia a este fármaco como de la tuberculosis MDR; referencia importante para iniciar de forma oportuna un tratamiento adecuado para droga resistencia, cortando así la cadena de transmisión.

Con la prueba Xpert MTB/RIF, esto puede conseguirse en 3 horas usando muestras frescas de esputo y sedimentos preparados.

Debido a que la detección de MTB depende del número de microorganismos presentes en la muestra los resultados dependen de una adecuada recolección de la muestra, manipulación y almacenaje.

El Xpert MTB/RIF no discrimina entre bacilos vivos y muertos por lo tanto no se la puede utilizar para control de tratamiento. Un resultado positivo no necesariamente indica la presencia de organismos viables, también se amplifica el ADN de los organismos muertos; sin embargo es confiable con respecto a la presencia de MTB y su resistencia a Rifampicina.

La resistencia positiva a Rifampicina por GeneXpert puede significar diagnóstico de mono-resistencia a rifampicina o de TB MDR.

La baciloscopia y el cultivo siguen siendo necesarios para el diagnóstico, control de evolución de tratamientos y vigilancia de la resistencia a las otras drogas incluyendo las de segunda línea.

Recomendaciones con respecto de la muestra:

Las muestras que el equipo Genexpert puede procesar deben ser de origen exclusivamente broncopulmonar, es decir: esputo, aspirado o lavado broncoalveolar y esputo inducido. El rendimiento de Gen expert para la detección de M. Tuberculosis no se ha demostrado para muestras no respiratorias como las de sangre, líquido cefalorraquídeo, heces u orina. Sin embargo, para futuras versiones del método se está considerando el análisis en los otros tipos de muestras para lo cual se dará la respectiva directriz oportunamente.

La cantidad mínima para poder trabajar este método es de 3 ml siendo 5 ml la cantidad óptima para poder trabajar incluso los otros métodos de diagnóstico (GRIESS y proporciones) que corroboraran el diagnostico de resistencia y permiten el estudio diagnostico completo y de validación.

No está indicado el estudio en muestras salivales con este equipo al igual que aquellas que contengan una cantidad mayor al 5% de sangre; las muestras con restos alimenticios o con partículas sólidas pueden interferir en el resultado de esta prueba (traban la máquina) por lo que se debe indicar al paciente el enjuague de la boca con agua previo a la recolección del esputo.

Educar al paciente sobre la forma correcta de obtener una muestra adecuada en cantidad y calidad según se indica en el manual de normas, y asegurarse de cerrar correctamente la rosca del frasco para evitar derrames durante el transporte.

Las muestras deben mantenerse y transportarse en cadena de frío (frigos) entre 2 y 8 C°, para las poblaciones alejadas considerar que la muestra se mantiene estable hasta 3 días en refrigeración. No dejar a temperatura ambiente ni expuesta a la luz solar.

Lavarse las manos después de manipular las muestras para evitar contaminación cruzada indicación tanto para el paciente como para el personal de salud.

El envío de las muestras para el procesamiento por método Genexpert debe hacerse en coordinación y por medio de los INH provinciales hasta el Instituto Nacional de Higiene – Laboratorio de Micobacterias (Guayaquil), de acuerdo a la logística instaurada en cada provincia, o en el caso de disponer del equipo en la misma provincia a donde el PCT disponga, de modo que se garantice el transporte adecuado en cadena de frío y con las medidas de bioseguridad.

Las unidades operativas que disponen de laboratorio provincial con un equipo de PCT en Tiempo real (GeneXpert) deberán enviar las muestras a sus respectivos laboratorios de Tuberculosis provinciales.

Enviar junto con la muestra la respectiva solicitud completando toda la información del formulario “SOLICITUD DE DIAGNOSTICO Y CONTROL BACTERIOLOGICO” de laboratorio, especificando el tipo de método en el casillero del método solicitado (geneXpert). Tomar en cuenta que debe realizarse además cultivo y Prueba de sensibilidad a drogas (PSD) con el método convencional (proporciones).

Criterios de uso clínico:

Este método será utilizado en los siguientes casos:

1. Como prueba diagnóstica de TUBERCULOSIS, independientemente del resultado de la baciloscopia:
 - Individuos VIH (+) positivos con sospecha de tuberculosis independientemente de los resultados del frotis.
 - En pacientes pediátricos con sospecha de tuberculosis en los que se ha logrado obtener una muestra pulmonar. (Recomendación de OMS).

En los casos pediátricos, es aconsejable tomar tres muestras por paciente con el fin de aumentar la sensibilidad, mientras que en pacientes VIH positivos se sugieren dos muestras, debido a que se tratan de casos con posibilidad de ser paucibacilares.

- En casos con alta sospecha de Tb con BK (-) negativo.
- Además, en otros grupos inmunodeprimidos sintomáticos respiratorios (no contactos) BK (-) negativo con alta sospecha clínica y radiológica.

2. Como prueba diagnóstica de resistencia a RIFAMÍCINA, con baciloscopia positiva previa, en:

- Contactos de casos de TB resistente a drogas
- Fracaso a esquema uno y esquema dos.

En el caso de tener un paciente con SOSPECHA DE RESISTENCIA se deberá enviar a realizar PSD utilizando el método de Nitrato reductasa (GRIESS) y proporciones.

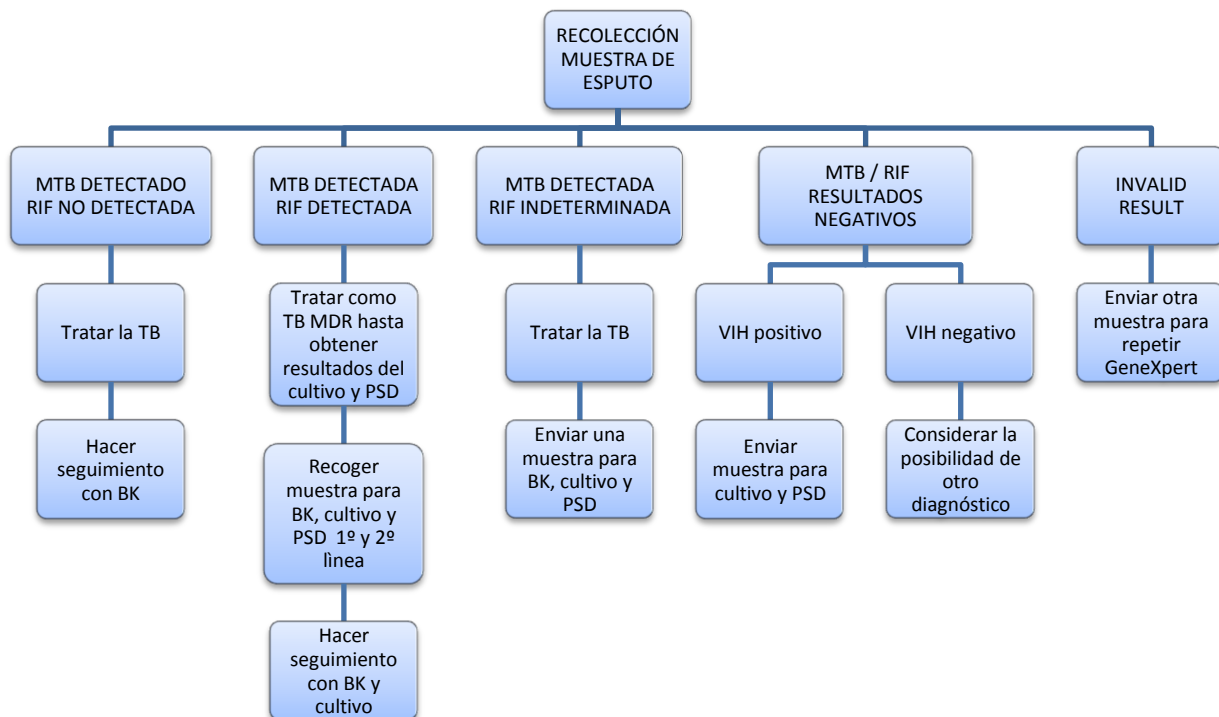
- Todas las categorías de re-tratamiento: abandono recuperado, recaída, otros (incluye tratamientos particulares).
- Personal de salud diagnosticado de Tb.
- Personas privadas de la libertad (PPL) con síntomas compatibles con tuberculosis.

En todas las categorías mencionadas se debe solicitar una segunda muestra en caso de salir negativa la primera por su alta sospecha de infección con TB.

Además, en todo paciente VIH positivo con sospecha de tuberculosis con resultados de genexpert negativo debe solicitarse una segunda muestra de esputo para realizar cultivo y PSD.

A toda muestra que se realice Genexpert y resulte POSITIVO también se analizará con cultivo y PSD por método convencional (proporciones de Canetti) para primera línea debido a que existe un pequeño porcentaje de resultados falsos positivos y además para conocer la sensibilidad de las demás drogas antituberculosas. En los casos que ameriten se deberá también solicitar PSD para segunda línea, especificando este en la solicitud de examen bacteriológico.

Cuadro 1. Flujograma de procedimientos según reporte del resultado



Interpretación de resultados:

Los resultados son interpretados por el sistema GeneXpert a partir de las lecturas de la fluorescencia de la muestra. A mayor fluorescencia menor es el número de ciclos (Ct). El reporte arroja dos resultados semicuantitativos: uno en relación a la detección de M. Tuberculosis y otro reportando lo relacionado a la resistencia a Rifampicina.

MTB detected (Micobacteria TUBERCULOSIS detectado)

Los reportes de resultado positivo para DETECCIÓN DE MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS son mostrados en niveles: alto, medio, bajo y muy bajo, de acuerdo a los valores de Ct del MTB presente en la muestra.

Los valores Ct más bajos representan una concentración inicial más alta de ADN, en cambio valores Ct más altos representan una concentración más baja de ADN.

Sin embargo todos los niveles implican detección del bacilo y por tanto **diagnóstico de TUBERCULOSIS**

Rif resistance DETECTED (resistencia a RIFAMPICINA detectada)

Únicamente en los resultados para MTB positivo (MTB DETECTED) se podrá determinar la resistencia a Rifampicina.

Los resultados que reporten RESISTENCIA A RIFAMPICINA DETECTADA demuestran que el equipo ha detectado una mutación en el gen *rpoB* que se encuentra dentro de los límites establecidos de Ct.

Los resultados del PCR en tiempo real se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.

Los resultados pueden ser afectados por antecedentes de terapia antibiótica o actual, por lo tanto no puede evaluarse el éxito o fracaso del tratamiento por medio de este test debido a que el ADN puede persistir tras el tratamiento antimicrobiano recordando que también amplifica organismos muertos.

En este equipo no es posible hacer el diagnóstico de las *micobacterias* atípicas (MNT) pues está configurado de tal manera que no sean detectadas (MTB no detectado) y además, si estuviesen presentes en combinación con M. Tuberculosis no hacen interferencia en su detección, incluso en presencia de múltiples colonias de MNT.

Los organismos que no son micobacterias y que abarcan un amplio rango de patógenos, contaminantes comunes y flora microbiana habitualmente presente en el esputo o la boca no son identificados, arrojando correctamente un resultado negativo.

En conclusión, los reportes se los realizará de la siguiente manera:

Cuadro 2. Ejemplo de reporte

Ampliar (Ctrl+0)



Ministerio de Salud Pública
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE Y MEDICINA TROPICAL
"LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ"

NUMERO DE LA MUESTRA: 155

NOMBRE DEL PACIENTE: XXXXXXXX

EDAD: años

TIPO DE MUESTRA: Espudo

PROCEDENCIA: Área de Salud N XXXXXXXX

MEDICO:

FECHA: 26 de Julio de 2012

Análisis en:	Version	Tipo de Analisis
Xpert MTB-RIF Assay G4	5	Diagnóstico in vitro
PCR en tiempo real		

RESULTADO DEL TEST: Mycobacterium Tuberculosis: Positivo Alto

TEST DE RIFAMPICINA: Resistente

OBSERVACION:

Atentamente.

Dr.

LIDER LABORATORIO INH PROVINCIA

Razones para repetir el ensayo:

Se debe repetir la prueba en aquellas muestras en las que el equipo ha arrojado resultados: NO VALIDO, ERROR O SIN RESULTADO, para lo cual se solicitará una nueva recolección,

posiblemente por dificultades en la preparación de la muestra, falla del equipo o muestra insuficiente.

Sensibilidad y especificidad:

La sensibilidad analítica del Xpert MTB/RIF detecta desde 5 copias de ADN y 131 UFC/ml (Unidades formadoras de colonias) de MTB en esputo.

La sensibilidad del ensayo Xpert MTB/RIF, según investigaciones realizadas por el fabricante, en pacientes clasificados como negativos para baciloscopia y positivos para cultivo (BK-, C+) es de 90,9% y de 100% para los clasificados como positivos para baciloscopia y cultivo (BK+,C+). Sin embargo en los estudios realizados por el laboratorio Supranacional de Massachusetts se ha encontrado una sensibilidad del 72,5% en pacientes Bk negativo, cultivo positivo (BK-,C+) al analizar una sola muestra, aumentando al 90,2% al investigar usando tres muestras del mismo paciente; dato que será el referente para nuestro país.

La especificidad en los pacientes negativos para baciloscopia y cultivo (BK-,C-) es de 98,3%

La sensibilidad para la resistencia a la rifampicina es de 96,7 y especificidad de 98,6%.

Registro de información:

Todos los casos que resultasen **PCR en tiempo real positivo** deben ser registrados como TBPBK positivo (bacteriología positiva), puesto que previo a esta prueba se debió realizar una baciloscopia en la cual se obtuvo resultado positivo. (especificados en el criterio 2 del uso clínico de este método).

En el caso de no contar con una baciloscopia previa o tener un resultado negativo y disponer de un resultado **positivo para PCR en tiempo real**, se lo registrará también como TBPBK Positivo (bacteriología positiva), tomando en cuenta que estos casos serán excepcionales (especificados en el criterio 1 del uso clínico de este método), debiendo cumplirse con lo establecido en el protocolo de uso.