

¿QUÉ APORTAN LOS MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN GENÉTICA AL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA?

José Manuel Querol Ribelles, Damiana González Granda y Rosario Forés Vañó

Servicios de Medicina Interna y Microbiología, Hospital Lluís Alcanyis. Xàtiva
(Valencia)

La tuberculosis sigue planteando en la actualidad importantes problemas epidemiológicos, de diagnóstico clínico y microbiológico, y terapéuticos. Hay que destacar la alta incidencia de la enfermedad en los países en vías de desarrollo, entre los que la tuberculosis constituye una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad, y el impacto que sobre ella está teniendo la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana. El retraso diagnóstico y el deficiente estudio de contactos son las causas más importantes de la eclosión de microepidemias en los países desarrollados. Los problemas terapéuticos que precisan atención prioritaria son el cumplimiento correcto de las pautas de tratamiento y el aumento de las resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* a los tuberculostáticos de primera línea.

En los últimos 100 años, la única prueba rápida para el diagnóstico de tuberculosis ha sido el examen microscópico, cuya sensibilidad es aceptable cuando la muestra analizada contiene más de 100.000 bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)/mL, aunque la sensibilidad del método mejora ostensiblemente cuando se trata la muestra y se utiliza el microscopio de fluorescencia, pudiendo entonces ser positiva la muestra con menos de 10.000 BAAR/mL. Esta sensibilidad podría ser aceptable en la tuberculosis pulmonar, pero es insuficiente en las formas paucibacilares de la enfermedad, como ocurre en la meningitis tuberculosa y, en general, en la de tuberculosis extrapulmonar. El aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo sigue siendo la clave del diagnóstico definitivo de tuberculosis, pero adolece de limitaciones, la más importante de las cuales es su lentitud que, aunque se ha visto parcialmente resuelta con la incorporación de nuevos métodos de cultivo, sobre todo radiométricos (BACTEC-460), aún siguen siendo necesarias de dos a tres semanas para conseguir el crecimiento e identificación de *M. tuberculosis* con la aplicación adicional de sondas de DNA (AccuProbe® test).

Hace algo más de 10 años el desarrollo tecnológico permitió la aparición de métodos de amplificación genética (AG) que fueron rápidamente introducidos para el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. Las pruebas de biología molecular actualmente en uso en el laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis son AMTDT (Gen-Probe), basado en la amplificación enzimática del RNA ribosómico, AMPLICOR (*Mycobacterium tuberculosis* PCR test, Roche Diagnostic Systems) basado en la amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el LCx (LCR *Mycobacterium tuberculosis* assay, Abbott Laboratories), sistema de amplificación que utiliza la reacción de la ligasa. Aportaciones recientes, todavía no generalizables, son la PCR múltiple para identificación en una misma muestra de diferentes especies micobacterianas y, sobre todo, la posibilidad de detectar en la muestra clínica genes de resistencia a los distintos tuberculostáticos de primera línea.

Tras la euforia inicial de los primeros años, en los que se presumía que podría sustituir al examen microscópico en el diagnóstico rápido de la tuberculosis, se pasó a un periodo de cierto pesimismo debido a problemas de reproducibilidad de los resultados entre los distintos laboratorios, resuelto en parte en la actualidad tras la introducción de los métodos comerciales semiautomatizados. Aún con todo, el papel de los métodos de AG aún constituye un dilema, ya que la mayoría de estudios publicados parten de muestras más o

menos seleccionadas, la mayoría patrocinados por las propias casas comerciales, mientras que faltan estudios amplios, multicéntricos, en los que se demuestre definitivamente la utilidad de estas pruebas en la práctica diaria de los laboratorios de microbiología.

MENINGITIS TUBERCULOSA

Probablemente, la meningitis tuberculosa es la forma de tuberculosis que mayores problemas diagnósticos plantean al clínico. Es una situación urgente, la muerte es casi segura sin tratamiento y, si se retrasa la implantación de éste, las secuelas neurológicas pueden ser graves e irreversibles. La sospecha clínica no siempre es consistente y, aunque el examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) aporta datos sugestivos, como son pleocitosis linfocitaria, hipoglucorraquia y el aumento de la cifra de adenosinadesaminasa (ADA), habitualmente se inicia un tratamiento empírico sin tener la certeza de que el diagnóstico será confirmado.

El diagnóstico microbiológico clásico no tiene prácticamente ninguna utilidad ya que el examen microscópico es positivo en menos del 10% de los casos, y el cultivo, aún siendo positivo, tardará más de dos semanas en el mejor de los casos. Así las cosas, los métodos de AG constituyen una ayuda inestimable en el diagnóstico de este cuadro clínico. Ante la ausencia de un “patrón oro” en el diagnóstico definitivo de la tuberculosis meníngea es difícil evaluar la introducción de cualquier nuevo método diagnóstico. No obstante, si tomamos en consideración los estudios publicados que consideran el diagnóstico de la meningitis tuberculosa como confirmado (aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo) o altamente probable (manifestaciones clínicas compatibles, pleocitosis linfocitaria e hipoglucorraquia, respuesta al tratamiento tuberculostático), la sensibilidad de los métodos de AG oscila entre el 60% y el 100%, y la especificidad del 80% al 100%. Podemos concluir que los métodos de AG son de elección en el diagnóstico de meningitis tuberculosa por su rapidez, especificidad y sensibilidad. Debería ser actualmente una técnica habitual en el diagnóstico del síndrome meníngeo con sospecha de esta etiología.

FORMAS EXTRAPULMONARES DE LA TUBERCULOSIS

El diagnóstico de las formas extrapulmonares de la tuberculosis, aunque poco importante desde el punto de vista epidemiológico, constituye sin embargo un reto para el clínico debido a lo proteiforme de sus manifestaciones, en ocasiones a la escasa expresividad clínica y, en la mayoría de los casos, a las dificultades que plantea la confirmación microbiológica mediante los métodos clásicos. Existen muchos estudios publicados comparando los métodos de AG con el examen microscópico y el cultivo, la mayoría con muestras seleccionadas y, por lo tanto, no totalmente extrapolables sus resultados a la práctica diaria. En la tabla se muestran algunos de los estudios más representativos en muestras clínicas no respiratorias (pus, orina, sangre, LCR, biopsias, líquido pleural, líquido ascítico, heces) que evalúan la eficacia de los métodos de AG en comparación con el cultivo.

| Autor | Método | Nº muestras | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|-------------------|---------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|
| Tortoli, 1997 | LCx | 147 | 71 | 99 |
| Lindbrathen, 1997 | LCx | 17 | 90 | 97 |
| Piersimoni, 1998 | AMTDT | 184 | 54 | 99 |
| Gamboa, 1998 | LCx | 526 | 78 | 99 |
| Tortoli, 1999 | AMPLICOR | 113 | 59 | 99 |
| Brown, 1999 | AMTDT | 21 | 67 | 75 |
| Ruiz, 2000 | AMTDT | 57 | 53 | 100 |
| Ruiz, 2000 | LCx | 57 | 63 | 100 |

Tomando como término de comparación para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar el aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo, los métodos de AG tienen una menor sensibilidad, sin embargo, en estas situaciones clínicas, el método de referencia debería ser el diagnóstico clínico ya que no siempre el cultivo es positivo en estas situaciones y, en la práctica clínica, son muchos los casos en que se inicia el tratamiento tuberculostático sin diagnóstico microbiológico, basado en una sospecha clínica sólida, datos histopatológicos (hallazgo de granulomas caseificantes en la biopsia pleural, hepática o ganglionar), radiológicos (alteración de la vía excretora urinaria en la tuberculosis renal) o datos bioquímicos (elevación de la ADA en líquido pleural o cefalorraquídeo) e, incluso, con la sola evidencia epidemiológica. En este contexto clínico es donde los métodos de AG muestran mayor sensibilidad que el examen microscópico y el cultivo, aunque los resultados deben interpretarse siempre dentro de este contexto.

Comentario adicional merece la utilidad de los métodos de AG en los en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, en los que la inmunodepresión celular grave puede hacer que la enfermedad tuberculosa adopte formas atípicas, como un cuadro de fiebre de origen desconocido, enfermedad granulomatosa no caseificante, tuberculosis pulmonar con radiografía de tórax aparentemente normal, coinfección por diferentes microorganismos, entre otras. En estas situaciones se puede detectar *M. tuberculosis* en muestras clínicas mediante PCR y deben interpretarse como existencia de enfermedad, y no sólo de infección, en la mayoría de los casos.

DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR

Para valorar la eficacia de los métodos de AG en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, en realidad lo que interesa es compararlos con el examen microscópico como método de diagnóstico rápido. La sensibilidad del éste es variable, aunque la mayoría de los autores la sitúan en torno al 60-70%, lo que lleva a iniciar tratamientos basados en la sospecha clínica, o al retraso inapropiado de los mismos en espera del resultado del cultivo.

La sensibilidad de los métodos de AG en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, tomando como referencia el cultivo, oscila entre el 85 y el 100%. Cuando se consideran las muestras BAAR positivas la sensibilidad de los métodos de AG puede llegar al 99%, y lo que es más importante, entre el 30% y el 60% de las muestras negativas tras examen microscópico son positivas por AG. Una ventaja adicional de los métodos de AG en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar es la confirmación de que las muestras positivas por tinción y por AG contienen *M. tuberculosis*. Así pues, los métodos de AG son actualmente el método de elección para el diagnóstico rápido de la tuberculosis. En nuestro laboratorio de microbiología, en un estudio prospectivo (datos no publicados) basado en la aplicación sistemática de la LCx en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, encontramos que este método aportó el diagnóstico inicial de tuberculosis en el 30% de los casos, siendo la sensibilidad respecto al cultivo del 84%, y la combinación de la LCx y la tinción de Ziehl-Neelsen permitió el diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar en el 90% de los casos.

Aunque la indicación aceptada de los métodos de AG es, precisamente, la confirmación de que la micobacteria detectada en el examen microscópico es *M. tuberculosis*, la utilidad en la práctica clínica es mayor si se interpretan los resultados en el contexto clínico adecuado como la sospecha de primoinfección tuberculosa en un ambiente epidemiológico de riesgo, lesiones pulmonares en pacientes inmunodeprimidos con alto riesgo de reactivación de lesiones residuales o, incluso, para confirmar retrospectivamente el diagnóstico de tuberculosis en pacientes tratados empíricamente desde uno a tres meses antes. En nuestra experiencia, en un estudio realizado en 105 pacientes diagnosticados de tuberculosis pulmonar, detectamos 10 pacientes cuyo cultivo de esputo fue negativo y la PCR positiva, de éstos, cinco formaban parte de un estudio de contactos por una microepidemia escolar de tuberculosis y mostraban, además de la intradermorreacción

positiva a la tuberculina, un infiltrado pulmonar en los lóbulos superiores, tres presentaban un infiltrado pulmonar no cavitado y fueron detectados en un estudio de contactos de alto riesgo, una joven de 14 años tenía un eritema nodoso con radiografía de tórax normal y su madre había sido diagnosticada recientemente de tuberculosis pulmonar y, finalmente, un paciente tenía una meningitis tuberculosa con radiografía de tórax normal y, a la semana de obtener el esputo, ya comenzó a apreciarse el patrón miliar en un control radiológico.

ANÁLISIS DE LAS DISCREPANCIAS

Probablemente es del análisis de las discrepancias entre el examen microscópico, el cultivo y los métodos de AG en un contexto clínico adecuado donde mejor se puede evaluar la utilidad real de los métodos de AG en la práctica clínica. Teóricamente, se pueden dar varias situaciones fruto de la combinación de los tres métodos diagnósticos, y cada una de ellas debe interpretarse sin olvidar el paciente del que procede la muestra.

Si el examen microscópico es negativo y la AG positiva, probablemente se trata de una tuberculosis y esta discrepancia sería debida a la mayor sensibilidad de la AG. Si el examen microscópico es positivo y la AG negativa, probablemente estemos ante una infección por una micobacteria atípica que deberíamos investigar exhaustivamente. Si la AG es positiva y el cultivo es negativo podemos estar ante una tuberculosis paucibacilar o una tuberculosis tratada, aunque también podría tratarse de un falso positivo de la AG, de ahí la necesidad de analizar los resultados en el contexto clínico del paciente. Por último, si la AG es negativa y el cultivo positivo se trata de una tuberculosis, salvo contaminaciones exógenas.

La interpretación del análisis de las discrepancias obviamente parte de la base de una sospecha clínica, y una vez descartados los problemas inherentes a las técnicas, como son la contaminación, el procesado correcto de las muestras o la presencia de inhibidores enzimáticos. Por eso, en estas situaciones de discrepancia, es conveniente repetir las técnicas de diagnóstico rápido, es decir, el examen microscópico y la AG.

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS DE AG

A modo de resumen, las ventajas que aportan los métodos de AG respecto a los métodos clásicos en el diagnóstico de tuberculosis son la sensibilidad respecto al examen microscópico y la rapidez respecto al cultivo en tuberculosis pulmonar. En la tuberculosis extrapulmonar los métodos de AG son más sensibles que el examen microscópico y que el cultivo. Además, la AG permite la confirmación rápida de que el BAAR detectado en el examen microscópico es *M. tuberculosis*. Una ventaja adicional poco explorada es la utilización de AG en los medios de cultivo líquido, cuando tanto el examen microscópico como la AG de la muestra han sido negativas, lo que puede aportar resultados más precoces que la utilización de sondas de DNA.

Entre las limitaciones de los métodos de AG hay que destacar que puede no ser un método tan rápido como se propugna cuando se utiliza en laboratorios de microbiología que procesan pocas muestras, debido a que la técnica sólo sería rentable si se realiza una vez a la semana. Otra limitación a destacar es el análisis coste-eficacia, teniendo en cuenta que, en la situación actual, es un método que complementa pero no desplaza a los anteriores y, por lo tanto, significa un aumento de recursos humanos y materiales.

Probablemente, la falta de reproducibilidad es la limitación más importante de los métodos de AG. Hasta ahora, estas técnicas están semiautomatizadas, lo que puede ser una de las causas de la falta de esta falta de reproducibilidad, incluso con métodos comerciales. Noordhoek *et al.*, en un estudio de control de calidad realizado entre 30 laboratorios que debían estudiar mediante AG 20 muestras de esputo (10 negativas, 5 con

100 BCG/ml y 5 con 1000 BCG/ml) encuentran que sólo cinco realizaron la identificación correcta, 17 laboratorios detectaron BCG en las muestras negativas; de los 13 laboratorios que no tuvieron falsos positivos, sólo cinco detectaron BCG cuando la carga era de 100 micobacterias/ml. Además, no hubo dos laboratorios que utilizaran la misma técnica durante todo el procedimiento, 22 utilizaron la PCR y 8 Amplicor o AMTDT. Finalmente, sólo 17 laboratorios utilizaron dUTP/uracil DNA glucosilasa para evitar la contaminación cruzada por productos de amplificación, lo que no impidió que en ocho ocasiones obtuvieran falsos positivos.

Una limitación adicional al empleo habitual de los métodos de AG en la práctica clínica diaria es el desconocimiento, por parte de los clínicos, del significado de un resultado positivo en una situación discrepante, así como el significado epidemiológico en términos de infectividad a la hora de efectuar un estudio de contactos. La respuesta a esta última limitación debe venir de estudios prospectivos de aplicación sistemática de los métodos de AG en los laboratorios de microbiología, sin selección de pacientes ni de muestras.

INDICACIONES DE LOS MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

Partiendo de la base de que se debe intentar diagnosticar la enfermedad tuberculosa por cualquier método microbiológico sólo cuando existe sospecha clínica, las indicaciones de los métodos de AG podrían ser:

- a) Confirmación de *M. tuberculosis* en muestras BAAR positivas.
- b) Diagnóstico rápido en muestras respiratorias BAAR negativas.
- c) Diagnóstico rápido de casos difíciles (meningitis tuberculosa, tuberculosis diseminada en pacientes con SIDA).
- d) Evitar técnicas cruentas (biopsia pleural, extirpación de adenopatías, biopsia hepática, biopsia ósea).
- e) Evitar tratamientos empíricos ante cuadros donde los métodos tradicionales han sido poco rentables (tuberculosis renal, tuberculosis intestinal).

BIBLIOGRAFIA

AUSINA V, GAMBOA F, GAZAPO E *et al.* Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:1996-2002.

BERGMAN JS, WOODS GL. Clinical evaluation of the Roche AMPLICOR PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996; 34:1083-1085.

BONINGTON A, STRANG JI, KLAPPER PE *et al.* Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 1998; 36:1251-1254.

BROWN TJ, POWER EG, FRENCH GL. Evaluation of three commercial detection systems for *Mycobacterium tuberculosis* where clinical diagnosis is difficult. J Clin Pathol 1999; 52:193-197.

CAWS M, WILSON SM, CLOUGH C, DROBNIOWSKI F. Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 2000; 38:3150-3155.

- FOLGUEIRA L, DELGADO R, PALENQUE E, AGUADO JM, NORIEGA AR. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* bacteriemia by PCR. J Clin Microbiol 1996; 34:512-515.
- GAMBOA F, DOMINGUEZ J, PADILLA E *et al.* Rapid Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. J Clin Microbiol 1998; 36:1324-1329.
- HEIFETS L. Dilemmas and realities of rapid diagnostic test for tuberculosis. Chest 2000; 118:4-5.
- PATNAIK M, LIEGMANN K, PETER JB. Rapid detection of smear-negative *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and sequencing for rifampicin resistance with DNA extracted directly from slides. J Clin Microbiol 2001; 39:51-52.
- PIERSIMONI C, CALLEGARO A, SCARPARO C *et al.* Comparative evaluation of the new Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:3601-3604.
- QUEROL JM, FARGA MA, GRANDA D, GIMENO C, GARCIA-DE-LOMAS J. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary Tuberculosis. Chest 1995; 107:1631-1635.
- ROHNER P, JAHN EI, NINET B *et al.* Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis with the LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay and comparison with conventional diagnostic techniques. J Clin Microbiol 1998; 36:3046-3047.
- TELENTI A, ISEMAN M. Drug-resistant tuberculosis: what do we do now?. Drugs 2000; 59:171-179.
- TORTOLI E, TRONCI M, TOSI CP *et al.* Multicenter evaluation of two commercial amplification kit (Amplicor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 33:173-179.
- WOODS GL. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:1002-1006.