

Nuevos métodos diagnósticos de la tuberculosis

JUAN JOSÉ PALACIOS

Unidad de Referencia Regional de Micobacterias. Hospital Universitario Central de Asturias. I.N. Silicosis. Oviedo. España.

Hoy día, al igual que en los siglos precedentes, la tuberculosis constituye un problema sanitario de primer orden¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, cada año, se producen 8 millones de nuevos casos y que 3 millones de personas fallecen como consecuencia de esta enfermedad. Además, la tercera parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. En ausencia de una vacuna verdaderamente efectiva, el tratamiento de los casos de tuberculosis activa sigue siendo el apartado más importante de los programas de control de esta enfermedad. Es por esto que el diagnóstico rápido y preciso constituye uno de los pilares fundamentales de la lucha contra la tuberculosis.

Puntos clave

- El impacto de la tuberculosis continúa siendo enorme. La tercera parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. Al año se producen 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y 3 millones de fallecimientos por esta causa.
- Toda muestra clínica remitida al laboratorio de micobacterias debe ser examinada al microscopio y cultivada simultáneamente en un medio líquido (preferiblemente automatizado) y en un medio sólido.
- Los sistemas de hibridación de ácidos nucleicos permiten, en cuestión de horas, identificar micobacterias y detectar resistencias a rifampicina a partir de cultivos primarios. Son un complemento ideal para los medios de cultivo líquidos.
- Las técnicas de amplificación genómica permiten detectar *M. tuberculosis complex* directamente en la muestra clínica. Se recomiendan para todos los casos de alta sospecha diagnóstica. La sensibilidad es similar a la de los medios de cultivo líquidos.
- La demora diagnóstica, tradicionalmente considerada recalcitrante e inherente al laboratorio de micobacterias, no está hoy justificada. La tecnología actual permite disponer de resultados completos, incluido antibiograma, en menos de 30 días desde la recepción de la muestra.

Diagnóstico microbiológico

La contribución del laboratorio de microbiología al diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis implica la detección y aislamiento de las micobacterias, su identificación y la determinación de la susceptibilidad a fármacos con actividad antimicobacteriana².

Hasta hace poco más de 10 años, el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis se encontraba estancado, no se vislumbraban grandes cambios y se aceptaba cualquier demora diagnóstica como algo inherente al laboratorio de micobacterias, así como que, por diferentes motivos, para un buen número de casos nunca hubiera confirmación microbiológica. Los sistemas de cultivo en medios líquidos totalmente automatizados, junto con las técnicas de biología molecular aplicadas al campo de las micobacterias, han marcado un antes y un después en el diagnóstico de la tuberculosis, lo que ha hecho cambiar sustancialmente este panorama. El laboratorio de microbiología no puede permanecer ajeno a estos cambios³⁻⁶.

Detección y aislamiento de micobacterias

Todo lo expuesto no significa que todas las técnicas diagnósticas tradicionales estén obsoletas, un buen ejemplo es el examen microscópico, que permanece como piedra angular del control de la tuberculosis, ya que permite detectar rápidamente los casos con mayor índice de infectividad. La observación de bacilos ácido-alcohol resistentes en un espécimen clínico constituye la primera evidencia bacteriológica de la presencia de micobacterias. Existen diferentes opciones con similar rendimiento: Ziehl-Neelsen, Kinyoun, auramina-O, auramina-rodamina. Aunque es el procedimiento más simple y rápido que puede realizarse, su sensibilidad es muy baja, incluso empleando técnicas de concentración por centrifugación, ya que se precisan del orden de 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de muestra para que puedan ser detectados al microscopio.

En cuanto al cultivo de micobacterias, hay que destacar que ha experimentado grandes cambios y mejoras importantes. Tradicionalmente, para el cultivo de micobacterias se han empleado mayoritariamente medios sólidos (Löwenstein-Jensen, Coletsos, Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11) y, en menor medida, medios líquidos preparados en el propio laboratorio (Middlebrook 7H9, Dubos). La sensibilidad del cultivo convencional, que detecta entre 10 y 100 bacilos por

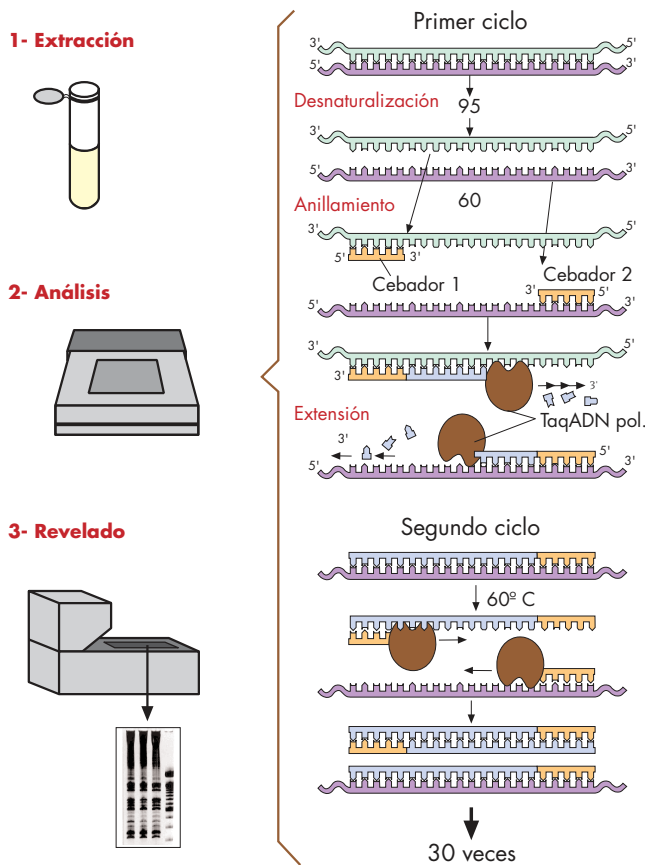


Figura 1. Proceso de amplificación del ADN por técnica de PCR

mililitro de muestra, es muy superior al examen microscópico, pero se precisan de 4 a 6 semanas para la obtención de resultados. En la década de los años ochenta apareció el primer sistema semiautomático de cultivo en medio líquido, denominado BACTEC 460 TB[®], con el que se mejoraron los porcentajes de recuperación de micobacterias y se acortaron significativamente, entre 2 y 3 semanas, los tiempos de detección. Presenta, como principales inconvenientes, la manipulación excesiva de los cultivos propia de este sistema y, sobre todo, la utilización de radioisótopos, lo que impidió su uso generalizado. Durante la década de los años noventa se comercializaron diferentes sistemas no radiométricos de cultivo en medio líquido; en un primer momento, para procesamiento manual (Septi-Chek AFB[®], MGIT[®]) y, posteriormente, ya totalmente automatizados (BacT/ALERT 3D[®], BACTEC 9000 MB[®], MGIT 960[®], ESP[®]). Estos sistemas igualan en prestaciones al sistema radiométrico y pueden ser utilizados por cualquier laboratorio de micobacterias. En ellos, tanto la incubación de los cultivos como la detección de crecimiento se realizan automáticamente, sin que se precise manipulación alguna desde que la botella es introducida en el sistema. En la actualidad, se recomienda para todo tipo de muestras clínicas el uso combinado de un medio de cultivo líquido (preferiblemente automatizado) junto con uno sólido²; esta asociación permite mejorar el rendimiento diagnóstico en un 20%⁷. Los actuales sistemas de cultivo permiten documentar más del 98% de todos los casos de tuberculosis, por lo que hoy día, más que nunca, es inexcusable la solicitud de estudios microbiológicos en todas las ocasiones en que la tuberculosis forme parte del diagnóstico diferencial²⁻⁶.

Identificación de las micobacterias

En cuanto a la identificación de las micobacterias a partir de los cultivos, conviene recordar que el género *Mycobacterium* engloba más de 80 especies diferentes, de las que más de la mitad, tanto las saprófitas como las patógenas, pueden recuperarse de los humanos y todas tienen una apariencia similar al microscopio. Los métodos tradicionales de identificación se basan en características fenotípicas, entre las que se incluyen datos morfológicos y resultados obtenidos en determinadas pruebas bioquímicas. Deben citarse, como inconvenientes, la lentitud de esta metodología (pueden invertirse varias semanas), su laboriosidad y el hecho de que se precisan microorganismos viables. En ocasiones, el proceso de identificación convencional puede llegar a suponer un auténtico reto para el laboratorio. También existen métodos convencionales rápidos, como la cromatografía, que analiza la composición lipídica de la pared celular y permite la identificación de micobacterias en unas horas, pero el equipamiento es muy caro y solamente se utiliza en centros de referencia.

Coincidiendo en el tiempo con las mejoras en los sistemas de cultivo, la identificación de micobacterias dio un giro significativo de la mano de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, con las que el proceso se agilizó y se puso al alcance de la mayoría de laboratorios. La identificación se completa en unas horas y, además, puede trabajarse directamente a partir de los cultivos primarios, lo que hace posible confirmar o descartar la presencia de *M. tuberculosis complex* el mismo día en que se detecta el cultivo positivo. Existen numerosos estudios publicados que presentan porcentajes de sensibilidad y especificidad cercanos al 100%². Lamentablemente, estos sistemas no son adecuados para identificar micobacterias directamente en muestras clínicas, ya que el umbral de detección ronda los 10⁵ organismos, cantidad pocas veces presente en ellas, por lo que su uso queda, por tanto, limitado a los cultivos.

Pruebas de susceptibilidad a fármacos

En lo referente a las pruebas de susceptibilidad a fármacos, se debe hacer hincapié en la necesidad de investigarlas de manera rutinaria. Son importantes tanto para el paciente como para los programas de vigilancia de la tuberculosis multirresistente. Existen múltiples métodos para llevar a cabo este tipo de estudios; los más recientes, y quizá los que han despertado más interés, son los incorporados a los sistemas automáticos de cultivo, que reducen a un período de entre 4 y 10 días el tiempo necesario para disponer de resultados, lo que puede tener trascendencia para el clínico. Sin embargo, siguiendo las recomendaciones de la OMS, los resultados deben confirmarse con métodos de referencia⁷.

Técnicas de amplificación genómica

Las técnicas de amplificación genómica (TAG) permiten detectar la presencia de *M. tuberculosis complex* directamente en la muestra clínica. Son técnicas rápidas, repro-

ducibles y altamente sensibles en las que un fragmento específico de ácidos nucleicos, presente en mayor o menor cantidad en la muestra clínica, se utiliza como molde para la síntesis enzimática *in vitro* de nuevas copias de esa secuencia diana hasta unos valores que la hagan detectable. Todas las TAG constan de 3 fases: extracción de los ácidos nucleicos, amplificación y detección del producto amplificado. La amplificación puede lograrse de diferentes formas, las más utilizadas son las conocidas como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), TMA (*transcription-mediated amplification*), LCR (reacción en cadena de la ligasa) y SDA (*strand displacement amplification*). Existen procedimientos "caseros" y diferentes sistemas comercializados; los primeros no son en absoluto recomendables para la rutina diagnóstica y, entre los últimos, 2 sistemas (MTD® y Amplicor®) cuentan con la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. para muestras respiratorias con baciloscopia positiva⁸; el MTD®, además, cuenta con la aprobación para muestras respiratorias con baciloscopia negativa. Conviene aclarar que, aunque ambos sistemas carezcan de la aprobación pertinente, numerosos trabajos demuestran que también son útiles en muestras extrarrespiratorias.

Existe una gran controversia en cuanto a cuál debería ser el uso adecuado de las TAG para el diagnóstico de la tuberculosis⁹; a ello han contribuido numerosos trabajos publicados con escasa calidad y mucho sesgo, que a menudo empleaban métodos "caseros", en los que se presentaban resultados obtenidos sin haber incluido controles de calidad adecuados que garantizaran la idoneidad del procedimiento de trabajo. Los resultados obtenidos en un estudio de control de calidad en el que participaron 30 laboratorios de 18 países corroboran lo comentado¹⁰. Fuera de toda controversia está la experiencia acumulada con este tipo de tecnología en otros campos de la medicina, por lo que un mínimo de sentido común hace pensar que este tipo de tecnología bien manejada supone una herramienta de gran utilidad para el clínico.

En España, una baciloscopia positiva es habitualmente sinónimo de *M. tuberculosis*, por lo cual, la utilización de las TAG únicamente con carácter confirmatorio en muestras con baciloscopia positiva, tal y como hasta hace poco preconizaban los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), no parece que suponga una gran aportación desde el punto de vista clínico. No debemos olvidar que, aproximadamente en la mitad de los pacientes con tuberculosis, el examen microscópico es persistentemente negativo, por lo que el diagnóstico de confirmación queda a expensas de los cultivos y se demora 2 o 3 semanas. Es precisamente en este tipo de pacientes en los que las TAG deben demostrar su utilidad.

Para el diagnóstico clínico deben emplearse TAG comerciales, ya que permiten que los resultados obtenidos sean reproducibles en cualquier laboratorio. Se recomienda incorporar las TAG a la rutina diagnóstica en todos los casos de alta sospecha de tuberculosis. El laboratorio debe

incluir controles positivos y negativos en cada lote de muestras procesadas. Los resultados deben interpretarse siempre en el contexto clínico de cada paciente. Un resultado negativo no descarta tuberculosis. Es importante recordar que las TAG pueden detectar material genético de organismos no viables, por lo que no están indicadas para el control del tratamiento. Las TAG que se comercializan en la actualidad no detectan micobacterias atípicas, sólo detectan *M. tuberculosis complex*, por lo que no sirven para diagnosticar micobacteriosis. Este tipo de tecnología complementa a la que ya existe y no sustituye a ninguno de los procedimientos tradicionales, por lo que debe tenerse en cuenta el impacto económico y hay que aplicar estrategias para un uso racional, pero teniendo a la vez presentes los costes que generan las demoras diagnósticas. Por todo esto, puede afirmarse que, hoy día, el retraso diagnóstico considerado recalcitrante e inherente al laboratorio de micobacterias no está justificado. La tecnología actual permite disponer de resultados completos, incluido antibiograma, en menos de 30 días desde la recepción de la muestra. Finalmente, hay que añadir que de la mano de la biología molecular asistiremos a nuevos cambios y puede que más importantes. Probablemente estemos en el umbral de una nueva era y éste sea el punto de partida.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

■ Metaanálisis

■ Ensayo clínico controlado

■ Epidemiología

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Ravigione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999;282:677-86.
2. ●● American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
3. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh Jr CR, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993;31:767-70.
4. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:961-79.
5. ●● Schluger NW. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2020-4.
6. ● Woods GL, Long TA, Witebsky FG. Mycobacterial testing in clinical laboratories that participate in the College of American Pathologists mycobacteriology surveys. Changes in practices based on responses to 1992, 1993 and 1995 questionnaires. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:429-35.
7. ● Drobniowski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:141-7.
8. Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:593-4.
9. American Thoracic Society Workshop. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1804-14.
10. Noordhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;34:2522-5.