

Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa

Rafael Laniado-Laborín*,‡,§

Martha Livier Enríquez-Rosales*

Alexei Fedórovish Licea Navarroll,¶

Palabras clave: Tuberculosis, diagnóstico, reacción en cadena de la polimerasa, PCR.

Key words: Tuberculosis, diagnosis, polymerase chain reaction, PCR.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la capacidad de un sistema no comercial de amplificación directa por reacción en cadena de la polimerasa para identificar a *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar y baciloscopía positiva.

Material y métodos: Se analizaron muestras de expectoración y líquido pleural por medio de amplificación

directa por reacción en cadena de la polimerasa, utilizando las secuencias ^{5'}CAGCCCGCTGGAGT-CCCGCGGA^{3'} y ^{5'}GCGCGTTCACCATGGACACCG^{3'}. Se utilizó como estándar de oro el cultivo en Lowenstein-Jensen.

Resultados: Se incluyeron 79 pacientes consecutivos y un total de 212 especímenes. Utilizando el cultivo como estándar de oro, la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en las muestras de expectoración fue de 97%, y su valor predictivo positivo de 57%. La reacción en cadena de la polimerasa fue positiva en 54 (98.18%) de los 55 casos con baciloscopía positiva en expectoración.

Conclusión: La sensibilidad y el valor predictivo positivo de la secuencia utilizada para identificar a *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de expectoración con baciloscopía positiva, son similares a la reportada en los estudios clínicos. Su aplicación permitirá identificar rápidamente a los pacientes infectados con micobacterias tuberculosas y distinguirlos de aquellos infectados por micobacterias no tuberculosas.

* Hospital General de Tijuana, ISESALUD

‡ Facultad de Medicina-Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California

§ Sistema Nacional de Investigadores, Institutos Nacionales de Salud

¶ Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería/Universidad Autónoma de Baja California

|| Departamento de Biotecnología Marina/Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

Correspondencia:

Rafael Laniado-Laborín,

Médico cirujano, Maestro en Salud Pública.

Emiliano Zapata 1423

Zona Centro, código postal 22000

Tijuana, Baja California

Teléfono / fax 01(6) 686-5626

E-mail: laniado@net-pla.net

Trabajo recibido: 15-I-2001; Aceptado: 27-III-2001

ABSTRACT

Objective: To evaluate the efficacy of a non-commercial direct amplification test based on the polymerase chain reaction to identify *Mycobacterium tuberculosis* in patients with presumptive diagnosis of pulmonary tuberculosis and smear-positive sputum.

Material and methods: Sputum and pleural fluid samples were analysed with the direct amplification technique, using the sequences 5' CAGCCCGCT-GGAGTCCCGCGGA^{3'} and 5' GCGCGTTCACCAT-GGACACCG^{3'} as primers and a Lowenstein-Jensen culture as gold standard.

Results: Seventy-nine consecutive patients and a total of 212 specimens were analysed. Using the gold standard, PCR sensitivity in sputum samples was 97% and positive predictive value, 57%. PCR was positive in 54 (98.18%) of the 55 specimens with positive septum microscopy.

Conclusions: Sensitivity and positive predictive value of the non-commercial primers used to identify *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum are comparable to reported clinical studies. Its clinical application will allow rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* infected patients, discerning them from patients infected with non-tuberculous mycobacteria.

INTRODUCCIÓN

El abordaje diagnóstico de la tuberculosis ha cambiado poco desde la época de Robert Koch, basándose todavía en la detección microscópica que carece de especificidad y tiene una sensibilidad máxima de 80%¹. La microscopía directa no permite distinguir entre *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y las micobacterias no tuberculosas (MNTB), la mayoría de las cuales son resistentes a los antifírmicos². La identificación de especie por cultivo requiere, aún con métodos radiométricos, de tres a cuatro semanas para obtener un resultado³. La identificación de especie reviste particular importancia en aquellas regiones en donde la prevalencia de infección por MNTB es elevada, tal y como se ha reportado en el noroeste de México^{4,5}. La identificación rápida de la especie de micobacteria es prioritaria en pacientes con micobacteriosis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en quienes la enfermedad ocasionalmente es debida a MNTB y por lo tanto requieren tratamiento diferente al tratamiento antituberculoso convencional². Es evidente pues, la necesidad de contar con pruebas diagnósticas que permitan establecer el diagnóstico e iniciar el tratamiento específico en forma rápida y oportuna.

Una de las innovaciones más revolucionarias de las ciencias básicas que ha alcanzado una extensa aplicación clínica en años recientes, ha sido la técnica de amplificación directa (DAT) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)¹. La mayoría de los investigadores, al utilizar la técnica de PCR para el diagnóstico de TB, han elegido la secuencia de inserción IS6110 del ácido desoxirribosa nucleico (ADN) de *M. tuberculosis* para el proceso de amplificación. Esta secuencia permite distinguir en forma confiable al complejo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) de todas las demás especies de micobacterias⁵.

Un obstáculo para la aplicación de esta tecnología en nuestro medio ha sido el elevado costo de los sistemas

comerciales disponibles para aplicación clínica, tales como el Amplicor (Roche Molecular Systems; Branchburg NJ), el MTD (Gen Probe, San Diego CA), o la prueba de *Stand Displacement Amplification Test* (Becton Dickinson). El desarrollo de un sistema de amplificación en el ámbito local permitiría su aplicación clínica con un costo accesible. Con esto en mente, un grupo de investigadores de la Universidad Autónoma de Baja California desarrolló un sistema de amplificación por PCR para *M. tuberculosis*. El fragmento de ADN a amplificar es una secuencia específica de *M. tuberculosis* aislada y caracterizada por Parra, Londoño, Del Portillo y Patarollo^{6,7}. Dicho gene es denominado *mtp40*, el cual codifica para una proteína del mismo nombre.

Con el propósito de estandarizar la técnica con esta nueva cadena de oligonucleótidos y determinar su sensibilidad, especificidad y valores predictivos en especímenes clínicos de origen respiratorio, se procedió a analizar por PCR los especímenes enviados para estudio microbiológico convencional al Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en forma consecutiva, todas las muestras de expectoración y líquido pleural que se recibieron en el Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California entre el primero de diciembre de 1998 y el 12 de febrero de 1999. Este laboratorio forma parte del sistema de laboratorios estatales del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE).

Con el fin de tener un seguimiento adecuado de los casos, sólo se incluyeron especímenes de pacientes hospitalizados y, de éstos sólo aquellos en que era posible seguir la evolución clínica hasta su resolución.

En todos los casos, además de los resultados de microbiología se obtuvo información epidemiológica (edad, sexo, lugar de nacimiento, ocupación, domicilio), clínica, de laboratorio de rutina (biometría hemática, química sanguínea y examen general de orina) y radiografía del tórax (una o más proyecciones posteroanterior y lateral).

Procesamiento de los especímenes clínicos

Todos los especímenes fueron recibidos en el Laboratorio Estatal de Tuberculosis de Baja California; con el fin de reducir la probabilidad de contaminación cruzada, el flujo de las muestras fue siempre unidireccional, realizándose los estudios microbiológicos en el Laboratorio Estatal y la detección de ácidos nucleicos en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Los especímenes se sometieron a concentración y descontaminación en forma convencional⁸ en una campana con flujo laminar y posteriormente, fueron examinados con la técnica de Ziehl-Neelsen y de Truant (fluorescencia). Para el cultivo se utilizó el medio de Lowenstein-Jensen. Los cultivos positivos se enviaron al INDRE para la identificación de especie y pruebas de sensibilidad a las drogas antituberculosas⁸.

Una porción del espécimen se congeló a -70°C para la posterior extracción de ácidos nucleicos.

Aislamiento de ácidos nucleicos

Se colocaron 100mL de las muestras previamente descontaminadas en un tubo Eppendorf y se centrifugaron por 5 minutos a 14,000rpm. El paquete celular se resuspendió en 200 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8) y 50mL de SDS al 10%. Las bacterias se sometieron a tres choques térmicos consecutivos, pasándose de un baño de hielo seco-acetona (-70°C) a un baño de agua a 37°C; después del choque térmico se incubaron a 65°C x 30'. Al término de este tiempo se adicionaron 250mL de fenol neutro a cada tubo con las micobacterias lisadas, se agitaron por vortex 30", y se centrifugaron a 14,000rpm x 5'. La fase acuosa se separó y se incorporó en otro tubo limpio, se le agregó 250mL de fenol-cloroformo 1:1, se agitó por vortex 30", y se centrifugó 5' a 14,000rpm. Posteriormente, las proteínas se precipitaron con dos volúmenes de cloroformo isoamílico 24:1, se agitó por vortex 30" y se centrifugó 5' a 14,000 rpm. Se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se precipitó el ADN con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 3.8) y dos volúmenes de etanol absoluto. Se incubó durante la noche a -20°C, y se centrifugó 10' a 13,000rpm. El ADN se lavó con dos volúmenes de etanol al 70% y se llevó a sequedad para su posterior utilización en la amplificación por PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN previamente purificado se resuspendió en 50mL de agua, se tomaron 5mL y se le agregaron 90mL de una mezcla de reacción que contenía 10mL del amortiguador comercial de Perkin-Elmer, MgCl₂ a una concentración final de 2.5mM, 8mL de mezcla de dNTP'S a una concentración final de 125 mM, 3mL de iniciador directo (primer) 20mM, 3mL de iniciador inverso (primer) 20 mM, 0.5mL de Taq AND polimerasa 5U/mL, llevándose a un volumen final de 100mL con agua libre de nucleasas. El contenido del tubo se mezcló por vortex. La reacción se sometió a una temperatura de 94°C x 10' y 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturación a 94°C x 10' y 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturación a 94°C x 30", alineamiento de los iniciadores a 55°C x 30" y extensión a 72°C x 1'. Después del ciclo final, la reacción fue terminada manteniendo una temperatura de 72°C x 10'. Los oligonucleótidos utilizados poseen las siguientes secuencias: directo^{5'}CAGCCGCT-GGAGTCCCGCGGA^{3'}, inverso: ^{5'}GCGCGTTCACCAT-GGACACCG^{3'}. Una vez realizada la amplificación, se tomaron 5mL de este producto y se procedió a realizar una segunda amplificación, utilizando el oligonucleótido directo y un tercer oligonucleótido interno, cuya secuencia es GCACCGCCGGGACACCCGCGCA. Las condiciones de amplificación fueron las mismas de la primera. El fragmento obtenido fue de 465pb; se utilizó una reamplificación del primer producto utilizando un oligonucleótido interno para asegurarnos que el fragmento correspondía a *M. tuberculosis*. Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa a una concentración de 1%. El tiempo promedio de electroforesis fue de 20 minutos, extrayéndose entonces el gel

para ser teñido con bromuro de etidio y ser analizado con luz ultravioleta.

Se corrieron controles negativos (con la mezcla de PCR pero sin DNA) y positivos, y todas las pruebas se corrieron por duplicado para reducir la probabilidad de contaminación.

Análisis estadístico

La evaluación clínica de los pacientes fue llevada a cabo por los médicos, sin que éstos conocieran los resultados de bacteriología y de la PCR; asimismo, los estudios de microscopía, cultivos y PCR fueron realizados por investigadores que desconocían la información clínica de los pacientes.

Se elaboraron tablas de 2x2 para el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

Las medias se reportaron \pm el error estándar de la media (EEM).

Para el análisis de la información se utilizó el paquete estadístico comercial SPSS 10.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Inc, Chicago III).

RESULTADOS

Se incluyeron 100 pacientes en quienes se sembró al menos un cultivo para micobacterias. Posteriormente, fueron excluidos 21 de ellos al perderse el seguimiento después de su egreso hospitalario, en todos el cultivo fue negativo. La edad promedio del grupo es de 40.41 ± 1.99 EEM, con rango de 0 a 89 años. De los pacientes, 62 eran varones (79%).

Se incluyeron un total de 212 especímenes, de los cuales 197 fueron muestras de expectoración y 15 de líquido pleural.

La Tabla I muestra los resultados que permiten calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la PCR en las muestras de expectoración (incluyendo tanto muestras con baciloscopia positiva como negativa), utilizando el cultivo como estándar de oro.

La sensibilidad de la PCR en muestras de expectoración fue de 97.0% (33/34), la especificidad de 16.6% (5/30), el valor predictivo positivo 56.9% (33/58) y el valor predictivo negativo de 83.3% (5/6).

De las muestras 72 fueron positivas por microscopía, y 122 positivas a la PCR. Presentaron BAAR positivo 62 muestras y 57 fueron positivas para PCR (92%). Las cinco muestras BAAR positivo/PCR negativo correspondieron a

Tabla I. Resultados de PCR vs cultivo (sólo muestras de expectoración).

	Cultivo (+)	Cultivo (-)	Total
PCR (+)	33	25	58
PCR (-)	1	5	6
Total	34	30	64

Sensibilidad 97%; Especificidad 16.6%

Valor predictivo positivo: 56.9%; Valor predictivo negativo: 83.3%

cuatro pacientes (un paciente tuvo dos muestras BAAR positivo/PCR negativo) de los cuales tres tuvieron al menos otra muestra BAAR positivo/PCR positivo; sólo un caso con baciloscopía positiva no tuvo al menos una muestra con PCR positiva. En total, la PCR fue positiva en 54 (98.18%) de los 55 casos con baciloscopía positiva en expectoración. La Tabla II muestra los resultados de la PCR de acuerdo al grado de positividad de la baciloscopía.

De los casos con PCR positivo y cultivo negativo (25 pacientes), 12 habían recibido o estaban bajo tratamiento antifímico y 10 fueron diagnosticados con tuberculosis sobre la base de los datos clínicos y radiográficos, mostrando resolución del cuadro con tratamiento antifímico. En tres casos con PCR positivo en expectoración no se encontró evidencia clínica, radiográfica o bacteriológica sugestiva de tuberculosis. Cuando se limita el análisis a los casos con baciloscopía positiva, el valor predictivo positivo se incrementa de 57 a 86%.

Cuando se clasifican los casos de acuerdo a los resultados del diagnóstico clínico y los resultados de la PCR en las muestras de expectoración, la sensibilidad es de 98.1% y la especificidad de 45.4% (Tabla III).

Sólo se examinaron por PCR 15 muestras de líquido pleural; al compararse los resultados de la PCR en líquido pleural con los del cultivo de líquido pleural, la sensibilidad fue de 33.3% (1/3), la especificidad de 12.5% (2/16), el valor predictivo positivo de 6.6% (1/15) y el valor predictivo negativo de 50% (2/4).

DISCUSIÓN

A pesar del entusiasmo generado por el desarrollo de las técnicas de amplificación directa por medio de la PCR, para el diagnóstico rápido de la tuberculosis, actualmente la única

Tabla II. Resultados de PCR en especímenes con baciloscopía positiva.

	PCR positivo	PCR negativo	Total
BAAR 1+	7	0	7
BAAR 2+	17	0	17
BAAR 3+	30	1	31
Total	54	1	55

Tabla III. Resultados de PCR vs clínica (sólo muestras de expectoración).

	Clínica (+)	Clínica (-)	Total
PCR (+)	52	6	58
PCR (-)	1	5	6
Total	53	11	64

Sensibilidad: 98.1%; Especificidad: 45.4%

Valor predictivo positivo: 89.6%; Valor predictivo negativo: 83.3%

indicación de esta técnica recomendada por la Sociedad Americana de Tórax es para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en especímenes de expectoración con microscopía positiva, ya que múltiples informes han demostrado en estudios clínicos una baja sensibilidad de la técnica de PCR en especímenes con baciloscopía negativa. La sensibilidad de los diversos sistemas de PCR para identificar a *M. tuberculosis* en especímenes con baciloscopía positiva es de 95-96%, mientras que aquellos con baciloscopía negativa, la sensibilidad es tan sólo de 48-53%⁹⁻¹¹.

En la presente investigación, la cadena de oligonucleótidos utilizados en la técnica de PCR presentó, utilizando el cultivo como estándar de oro, una excelente sensibilidad (97%) en los especímenes de expectoración; sin embargo, su especificidad (17%), y su valor predictivo positivo (57%), se encontraron muy por debajo del promedio reportado en la literatura.

Existen varias razones que pueden explicar la aparente baja especificidad observada en nuestro estudio:

1. De acuerdo con lo recomendado en la literatura, utilizamos el cultivo como estándar de oro a pesar de que es bien sabido que hasta un 20% de los casos de TB pueden tener un cultivo negativo³. El cultivo se debe considerar como un estándar imperfecto contra el cual se ha comparado la PCR. En todos los reportes sobre aplicación clínica de la PCR, cuando se utiliza el cultivo como estándar de oro, la especificidad de la técnica es baja, debido a un elevado número de "falsas positivas", es decir, especímenes con PCR positivo pero cultivo negativo; es por ello que, prácticamente sin excepción, los diversos investigadores⁵ utilizan además de la clasificación bacteriológica, una clasificación clínica para evaluar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de amplificación; cuando existe discrepancia al encontrar una PCR positiva y cultivo negativo, esta se aclara por revisión del expediente clínico, por seguimiento del caso y/o realización de nuevos cultivos^{12,13}. Diez de nuestros casos clasificados como "falsos positivos" presentaban un cuadro clínico y radiográfico sugestivo de tuberculosis, por lo que ha pesar de los estudios microbiológicos negativos fueron tratados con antifímicos; en todos ellos hubo una respuesta satisfactoria al tratamiento. Al igual que en los informes clínicos de la literatura, clasificamos a nuestros pacientes sobre la base del diagnóstico y evolución clínica, y no por los resultados del cultivo, la sensibilidad de la PCR es de 98%, el valor predictivo positivo es de 94.5% y el valor predictivo negativo de 83%.
2. En la literatura se recomienda no utilizar esta técnica en pacientes que han recibido tratamiento antifímico¹¹. El tratamiento incrementa el número de "falsas positivas", pues los pacientes bajo tratamiento eliminan bacilos no viables que pueden detectarse por microscopía o mediante técnicas de amplificación, pero que no se desarrollan en los medios de cultivo. Con el fin de determinar el rendimiento de esta técnica en la práctica diaria, nosotros decidimos incluir todos los especímenes que se recibieron en forma rutinaria en nuestro laboratorio.

Doce de los casos clasificados como "falsos positivos" habían recibido tratamiento, y de hecho seis de ellos tenían microscopia de esputo positiva. Es altamente probable que al menos estos últimos seis no correspondan a falsas positivas.

No obstante, a pesar de estas limitaciones, el cultivo sigue siendo utilizado como estándar de oro contra el cual se debe comparar el rendimiento diagnóstico de cualquier nuevo método diagnóstico. La especificidad de nuestra cadena de oligonucleótidos, comparada contra dicho estándar, es menor que la reportada en la literatura para sistemas similares.

CONCLUSIÓN

La secuencia utilizada en este proyecto tiene una sensibilidad y valor predictivo positivo adecuados para poder ser utilizada en muestras de expectoración con baciloscopía positiva, con el fin de identificar rápidamente a los pacientes infectados con micobacterias tuberculosas y distinguirlos de aquellos infectados por MNTB, las cuales habitualmente son resistentes a los antifímicos convencionales. Esto reviste particular importancia en pacientes infectados con el VIH, quienes con frecuencia presentan infección por MNTB.

REFERENCIAS

1. Heifets L. *Dilemmas and realities of rapid diagnostic tests for tuberculosis* (editorial). *Chest* 2000; 118: 4-5.
2. American Thoracic Society. *Diagnosis and treatment of disease caused by non tuberculous micobacteria*. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 94.
3. American Thoracic Society. *Diagnostic standards and classification of tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-1395.
4. Peter CR, Schultz E, Moser K, Cox M, Freeman R, Ramírez-Zetina M, et al. *Drug-Resistant pulmonary tuberculosis in the Baja California-San Diego County border population*. *West J Med* 1998; 169: 208-213.
5. Moran-Moguel MC, Hernandez DA, Peña-Montes de Oca PM, Gallegos-Arreola MP, Flores-Martínez SE, Montoya-Fuentes H, et al. *Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction in a selected population in north-western Mexico*. *Rev Panam Salud Pública* 2000; 7: 389-393.
6. Parra CA, Londoño LP, Del Portillo P, Patarroyo ME. *Isolation, characterisation and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: Identification of a species-specific sequence*. *Infect Immun* 1991; 59: 3411-3417.
7. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. *Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2163-2168.
8. Balandrano-Campos S, Anzaldo-Flores G, Peña-Flores GP, Betancourt-Morillo X. *Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR: Tuberculosis*. Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Organización Panamericana de la Salud. 1996.
9. American Thoracic Society. *Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use?* *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1804-1814.
10. Gallina M, Troupioti P, Rocco G, Sensalari G, Libanori E. *Predicting culture results for *Mycobacterium tuberculosis* complex. Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test*. *Chest* 2000; 116: 28-32.
11. Lebrún L, Mathieu D, Saulnier C, Nordmann P. *Limits of commercial molecular tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis*. *Eur Respir J* 1997; 10: 1874-1876.
12. Barnes PF. *Rapid diagnostic tests for tuberculosis. Progress, but not gold standard*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1497-1498.
13. Gladwin MT, Plorde JJ, Martin TR. *Clinical application of the *Mycobacterium tuberculosis* direct test*. *Chest* 1998; 114: 317-323.