

## **Optimización del diagnóstico de Tuberculosis en nuestro medio, mediante el uso del Laboratorio**

**Nora Guarín, M.D.** – CIDEIM, Colombia.

La tuberculosis es uno de los principales problemas de salud pública del mundo y, a diferencia de otras enfermedades, lograr su curación no es un asunto solamente individual del paciente, sino una responsabilidad del cuidado profesional, del sistema de salud pública y de la sociedad misma.

Según estudios de vigilancia de la OMS, en 1997 se detectaron 7,96 millones de casos nuevos de tuberculosis, 1,87 millones de muertes y 16,2 millones de casos existentes de la enfermedad (JAMA. 1999; 282:677-686).

La presentación pulmonar es la forma más usual de la enfermedad, pero las formas extrapulmonares pueden ocurrir como parte de una forma primaria o tardía generalizada, o como una reactivación de la tuberculosis acompañada o no de reactivación pulmonar. Su incidencia está relacionada con la prevalencia de la enfermedad. Los sitios más comunes de enfermedad extrapulmonar son los ganglios linfáticos del mediastino, el cuello y retroperitoneo, riñones, pleura, cuerpos vertebrales, glándulas suprarrenales, tracto gastrointestinal y meninges.

### **Diagnóstico de Tuberculosis**

El diagnóstico definitivo de tuberculosis debe ser probado idealmente por aislamiento por cultivo e identificación, lo cual facilita además la realización de pruebas de susceptibilidad a drogas en pacientes en quienes se sospecha multirresistencia y en lugares donde éste es un problema común.

### **Examen Directo**

El examen directo con coloración de Ziehl-Neelsen o coloración fluorescente (auramina O), aún teniendo una sensibilidad que varía entre 22-80% dependiendo del tipo de muestra, la centrifugación, la técnica de coloración, la habilidad del evaluador, etc., es la manera más rápida y económica de hacer un diagnóstico presuntivo, pero se requieren  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  bacilos por ml de esputo para tener un resultado positivo.

### **Cultivo**

El cultivo sigue siendo el estándar de oro con el cual se comparan los demás procedimientos diagnósticos. Debe hacerse en 2 medios diferentes para aumentar las posibilidades de recuperación temprana de la micobacteria. Los medios líquidos son muy útiles en muestras paucibacilares. El cultivo puede detectar desde 10-100 microorganismos viables. Otros métodos de aislamiento son el método radiométrico (BACTEC), el tubo

indicador de crecimiento micobacterial (MGIT) y métodos automatizados con sistemas monitorizados; aunque son muy eficientes, resulta muy costoso disponer de ellos en nuestro medio. Una alternativa para aislamiento temprano (2 semanas aproximadamente) en muestras con frotis positivo, es el cultivo por el método de microcolonia en capa delgada de agar Middlebrook, que es económico y fácil de implementar. Un estudio reciente en Colombia (Mejía y col, 1999) demostró una sensibilidad general de 83% frente al cultivo en medio de Lowenstein Jensen.

### **Técnicas de amplificación de Ácidos Nucléicos**

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se han trabajado ampliamente para detección de micobacterias, especialmente en muestras respiratorias, pero también en otros especímenes. Actualmente se encuentran comercialmente disponibles 3 kits para detección del complejo *M.tuberculosis* en muestras respiratorias de pacientes no tratados o tratados por menos de 7 días: un test se basa en PCR , amplificando una secuencia del gen para 16S rRNA (Laboratorios Roche); GEN PROBE utiliza amplificación mediada por transcripción a partir de rRNA (GenProbe) y Laboratorios ABOIT usa la técnica de LCR (ABBOTT LCx PROBE SYSTEM) amplificando DNA de un gen específico para *M. tuberculosis*. Los resultados de las 3 pruebas son comparables, la sensibilidad varía entre 70-100% y la especificidad es mayor del 98%; sin embargo, la sensibilidad es mayor cuando el examen directo es positivo. El uso de estos kits en muestras no respiratorias es promisorio, pero no se encuentra aún aprobado.

En los laboratorios de investigación se ha probado la amplificación de diferentes segmentos del genoma y se ha encontrado que la secuencia de inserción IS6110 tiene una sensibilidad que varía, según los estudios, entre 70-90% y una especificidad entre 90 y 95%. El uso de éstos métodos para fines de diagnóstico clínico resulta más económico que las pruebas comerciales, pero debe tener una validación previa que permita establecer su sensibilidad, especificidad y valor predictivo.

En CIDEIM se utiliza un PCR que amplifica el segmento de inserción *IS6110* con los primers Pt18 y INS2 e incluye un blanco modificado de *M. smegmatis* como control de inhibición, según la metodología de Kolk y col. (J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 672-678). Un procedimiento adicional de Dot blot aumenta la sensibilidad del método. Esta técnica aplicada en muestras respiratorias y evaluada frente al cultivo como estándar de oro, demostró una sensibilidad de 97% y una especificidad de 89%. Cuando éstos resultados se evaluaron frente a un diagnóstico definitivo de tuberculosis, la sensibilidad fue de 94%, la especificidad de 97% y los valores predictivos positivo y negativo de 96%. La sensibilidad frente a la microscopía fue muy superior, especialmente en muestras no respiratorias. Estos resultados sugieren que el PCR puede ayudar a confirmar o excluir rápidamente el diagnóstico de tuberculosis y a tomar decisiones terapéuticas en casos difíciles o en formas extrapulmonares. Debe tenerse en cuenta que la evaluación del PCR frente al cultivo como estándar de oro, presenta el inconveniente de que el proceso de decontaminación puede destruir más del 90% de los bacilos de la muestra y conducir a falsos negativos en el

cultivo, mientras que pueden conservarse secuencias de ácidos nucleicos detectables por PCR.

En CIDEIM se realizó un estudio (Villegas y col, en prensa) de evaluación comparativa de métodos diagnósticos para TBC pleural. PCR mostró una sensibilidad de 73,8% en pacientes con TBC confirmada, especificidad de 90% y un valor predictivo positivo de 81,6%. ADA tuvo una sensibilidad de 88%, especificidad de 85,7% y un valor predictivo positivo de 79%. La determinación de niveles de interferón gamma en el líquido pleural tuvo una sensibilidad de 85,7%, especificidad de 97,1% y valor predictivo positivo de 94,7%; la sensibilidad del cultivo fue de 48%, la especificidad y el valor predictivo positivo fueron de 100%. Estos resultados demuestran la utilidad de PCR, ADA e interferón gamma en el diagnóstico de TBC pleural, una forma de enfermedad frecuente en nuestro medio y donde la posibilidad de visualizar y aislar la micobacteria es baja.

Actualmente se está finalizando un proyecto realizado por NIH y CIDEIM, en el cual se evalúan comparativamente diferentes pruebas diagnósticas en pacientes sintomáticos respiratorios considerados como posibles enfermos de tuberculosis, con la forma de presentación paucibacilar. La evaluación incluye criterios clínicos, radiológicos, métodos convencionales y PCR en esputo. Los resultados permitirán conocer el valor de distintas estrategias diagnósticas, en este grupo de pacientes cuyo diagnóstico es especialmente difícil.

La TBC meníngea es otra forma de tuberculosis extrapulmonar que requiere la optimización del diagnóstico para hacerlo más eficiente y oportuno.

El diagnóstico temprano de la meningitis tuberculosa (que es la forma más frecuente de TBC del sistema nervioso central) es muy importante, dado que esta enfermedad puede tener un curso fatal si no se trata oportunamente o dar lugar a secuelas permanentes. El diagnóstico es difícil porque los signos clínicos no son muy específicos, el examen directo del LCR no suele tener una cantidad de microorganismos suficiente para ser detectada y los cultivos, con una sensibilidad que oscila entre 25% y 70%, pueden demorar hasta 8 semanas para dar un resultado. Otros métodos útiles como la cromatografía gas-líquido, no están disponibles fácilmente. Actualmente no existe una prueba molecular comercial licenciada para uso diagnóstico, pero se han realizado varios estudios utilizando LCR, PCR y amplificación mediada por transcripción. La cuantificación de citoquinas también podría ser de utilidad, especialmente la determinación de niveles de interferón gamma.

Los principales estudios realizados con PCR en líquido cefalorraquídeo han mostrado una sensibilidad entre 65-90% utilizando la amplificación del gen para la proteína MPB64, 33-54% con la secuencia de inserción *IS6110* y 60% con el kit comercial AMPLICOR de Laboratorios Roche.

CIDEIM, con la colaboración de entidades como ISS, Hospital Infantil Club Noel, Hospital Universitario del Valle y Fundación Valle del Lili, iniciará un estudio en pacientes con

sospecha clínica de meningitis tuberculosa, seleccionados bajo estrictos criterios epidemiológicos, clínicos, radiológicos y de laboratorio, para validación de pruebas que puedan ser de utilidad para hacer un diagnóstico temprano y tomar una decisión terapéutica oportuna. Los métodos a evaluar son niveles de interferón gamma, PCR con el segmento de inserción IS6110 comparado con AMPLICOR y pruebas convencionales (examen directo, cultivo y ADA). Con estos resultados confiamos en proporcionar a los clínicos otros elementos diagnósticos que, aplicados con criterio selectivo, puedan ayudar a prevenir las complicaciones y muertes derivadas del diagnóstico tardío de esta enfermedad.