

Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico

Rommy Teran¹, Jacobus H. de Waard²

¹ Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

² Programa Prometeo, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autores correspondientes:

Dr. Rommy Teran

Dr. Jacobus H. de Waard

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Central del Ecuador

Correos electrónicos:

riteran@uce.edu.ec

jacobusdeward@gmail.com

Palabras clave:

tuberculosis, diagnóstico molecular,

test de sensibilidad a drogas (DST),

NAATs, LAMP, Xpert MTB/RIF

Agradecimientos:

El programa Prometeo de la SENESCYT

(Secretaría de Educación Superior,

Ciencia, Tecnología e Innovación del

Ecuador) auspició este trabajo.

RESÚMEN

El laboratorio tiene un papel decisivo en el diagnóstico de tuberculosis (TB) así como en la identificación y determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes drogas (DST, del inglés, drug sensitivity testing). El diagnóstico de laboratorio basado solo en microscopía y cultivo, ha sido utilizado por largo tiempo, sin embargo, y debido al lento crecimiento de las micobacterias (3 a 4 semanas), se ha hecho indispensable la búsqueda de nuevos y rápidos métodos de diagnóstico. Desde inicios de los 90s, se dispone de técnicas moleculares para una rápida detección, identificación y DST del *M. tuberculosis*. El presente artículo hace una revisión de la nueva metodología que ha sido introducida en el laboratorio clínico. Nosotros discutimos sobre la microscopía LED y las técnicas basadas en el PCR para el diagnóstico de TB, ensayos inmunológicos para el diagnóstico de TB activa y latente, métodos de cultivo líquido y “line probe assays” para un rápido DST y métodos basados en PCR y ensayos de hibridización para la identificación de micobacterias. Aunque estas nuevas técnicas son útiles para tener un resultado rápido, enfatizamos en que el diagnóstico y seguimiento basado en el cultivo, es todavía el método de referencia

para la tuberculosis y que estas nuevas técnicas moleculares no pueden reemplazarlo, aunque proveen información preliminar y mejoran el manejo del paciente.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) una de las principales enfermedades infecciosas en el mundo y es responsable por más de 2 millones de muertes y 8 millones de nuevos casos anualmente. La enfermedad es causada por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*. La bacteria usualmente ataca los pulmones, pero podría infectar cualquier parte del cuerpo como los riñones, el intestino, la pleura, la columna vertebral y el cerebro. Y si no es tratada adecuadamente, esta enfermedad infecciosa puede ser fatal.

La estrategia de control más importante para la TB, es la detección temprana y el apropiado tratamiento de casos infecciosos. La tasa de detección de casos (TDC) global es de alrededor del 64%, lo cual implica que alrededor del 36% de casos de TB incidente no son detectados. Esto deja una brecha de aproximadamente 3.3 millones de personas con TB alrededor del mundo que se “perdieron”, tanto porque no fueron diagnosticadas o porque fueron diagnosticadas, pero esto no se reportó (1). Para las Américas, la TDC es alrededor del 79%, lo cual significa que anualmente 33,000 pacientes con TB no son detectados o reportados (1).

Los laboratorios tienen un rol central en el diagnóstico de TB, es así que reforzar su desempeño y capacidad, es prioritario para el control de esta enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de TB en la mayoría de laboratorios se hace por los llamados métodos convencionales y la mayoría de casos de TB son diagnosticados por baciloscopía. La baciloscopía tiene una sensibilidad de cerca del 60-70% de los casos de TB. Adicionalmente, alrededor del 25% de todos los

casos de TB son extrapulmonares y para el diagnóstico de esta presentación de TB, la examinación de esputo no sería aplicable, afectando la detección de estos casos. La implementación del cultivo para el diagnóstico puede mejorar la tasa de detección de TB en un laboratorio en alrededor de un 30 a 40%. El cultivo detecta casos con baja carga micobacteriana y también se solicita en casos en riesgo de ser TB resistentes para evaluar su sensibilidad a diferentes drogas (DST), o en casos donde se sospecha que la enfermedad se debe a otro miembro del género *Mycobacterium*. Estos dos métodos de laboratorio, la baciloscopía y el cultivo, son todavía los “gold standars” para el diagnóstico de TB, siendo el cultivo el método más sensible. Sin embargo, debido al lento crecimiento de las micobacterias, los resultados pueden tardar de 3 a 4 semanas, es así que nuevas y rápidas técnicas de diagnóstico son requeridas para mejorar el diagnóstico de TB y el manejo del paciente.

Desde inicios de los 90s, nuevas técnicas de laboratorio para el diagnóstico de TB y las pruebas de sensibilidad a drogas han sido desarrolladas, basadas en el uso de medios de cultivo líquidos, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, nucleic acid amplification tests), hibridización de ADN y técnicas para la detección de mutaciones, y detección de antígenos y anticuerpos. Esta mini revisión pretende ofrecer algo de información general sobre nuevas técnicas de laboratorio que están disponibles actualmente para el diagnóstico de TB activa o la detección de una infección latente por TB. Esta revisión abarca solamente las técnicas más importantes que se han desarrollado. La comparación de métodos no está dentro de los objetivos de este artículo y lectores interesados son referidos a la literatura más especializada.

MEJORAS EN LA BACILOSCOPÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB

La examinación microscópica de muestras de esputo, ha sido la base de la detección de casos de TB por más de 100 años y todavía es el método principal en sitios con presupuestos limitados, donde el diagnóstico de TB se basa únicamente en la tinción de Ziehl-Neelsen y la observación del frotis con el microscopio óptico. Este procedimiento detecta solamente alrededor del 60-70% de los casos de TB. Una alternativa es el uso del microscopio de fluorescencia, que puede ser 10% más sensible que el microscopio óptico, debido a que el bacilo fluorescente puede ser visto a un aumento más bajo y el frotis puede ser examinado en solamente el 25% del tiempo que toma examinarlo con el microscopio óptico. Sin embargo, ha sido difícil implementar este microscopio en el diagnóstico de TB debido al alto costo asociado con la compra de un microscopio con una lámpara de vapor de mercurio, la necesidad de reemplazar frecuentemente esta lámpara de UV, la cual dura solamente 200-300h, y la necesidad de un cuarto oscuro para la lectura de las placas (2).

El desarrollo reciente de la tecnología dio lugar al microscopio de fluorescencia, el mismo que usa un sistema de iluminación basado en la luz emitida por un diodo (LED) con un tiempo de vida útil de hasta diez mil horas, lo cual resulta en la microscopía de fluorescencia LED. Es así que microscopios fluorescentes LED relativamente económicos están disponibles. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha evaluado la eficacia de la microscopía LED, y los resultados mostraron que el diagnóstico con este microscopio fue más sensible (alrededor del 10%) que con el microscopio óptico (2,3). Basándose en estas consideraciones, la OMS recomienda que la microscopía convencional y la fluorescente sean reemplazadas por la microscopía LED.

EL CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

El “gold standard” para el diagnóstico de TB es todavía el aislamiento de *M. tuberculosis* en un medio de cultivo. El cultivo provee además aislados para identificación (basada en pruebas bioquímicas y moleculares) y para DST. Hasta inicios de los noventa, el cultivo era usualmente hecho en medio sólido basado en huevo como el Lowenstein-Jensen y el medio Stonebrink. Una desventaja del cultivo en estos medios sólidos es el lento crecimiento de la bacteria, que puede tomar al menos de 2 a 4 semanas o a veces más, antes de que el cultivo dé positivo.

Los medios líquidos tienen una incrementada sensibilidad para el crecimiento de *M. tuberculosis* (hasta un 20% de incremento en la positividad) y un reducido tiempo de detección (10-14 días versus 2-4 semanas). El inconveniente es la tasa de contaminación del medio líquido, el cual parece ser más alto en comparación con el sólido (4). La OMS recomienda el uso del medio sólido convencional junto con el medio líquido para el aislamiento primario de micobacterias.

El medio líquido consiste en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y, para evitar la contaminación con otros microorganismos, se agrega PANTA (una mezcla de antibióticos: polimixina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina). En la actualidad, se dispone también de sistemas de cultivos elaborados que están disponibles comercialmente. Estos van desde botellas simples y tubos tales como MGIT (BD Diagnostic Systems, USA), Septi-Chek AFB (BD, USA) y MB Redox (Biotest Diagnostics, USA) hasta sistemas semi-automatizados (BACTEC 460TB) y totalmente automatizados (BACTEC 9000 MB), BACTEC MGIT 960 (BD, USA), ESP Culture System II [Trek Diagnostics, USA] y MB/BacT ALERT 3D System (BioMérieux, NC). Para estudios comparativos

de estos sistemas (semi) automatizados, el lector puede referirse a literatura especializada (5, 6, 7).

HERRAMIENTAS BASADAS EN EL ADN PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB

Tests clásicos para la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, Nucleic Acid Amplification Tests)

Desde inicios de los años noventa, varias metodologías han sido publicadas para la detección de *M. tuberculosis* con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores oligonucleótidos para amplificar un fragmento de ADN específico para este microorganismo. Estos NAATs pueden arrojar resultados en 3-6 horas e incluyen a aquellos comerciales y a los “hechos en casa”, basados en un protocolo desarrollado en un laboratorio no-comercial. Cada NAAT usa un método diferente para amplificar regiones específicas del ácido nucleico del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

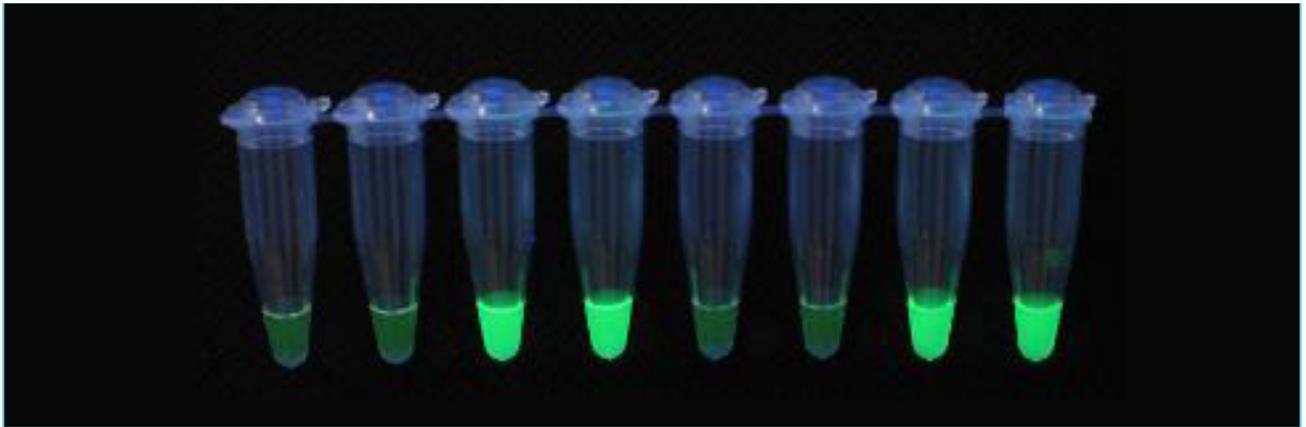
Varios NAATs comerciales existen y la FDA (U.S. Food and Drug Administration) ha aprobado el uso de algunos de ellos para muestras respiratorias solamente. Estos kits incluyen el GenProbe Amplified *M. tuberculosis* Direct test (AMTD), el Roche Amplicor MTB test, el Cobas Amplicor test, el Abbott LCx test, y el BD-ProbeTec (SDA) test (8). Ninguno de estos tests ha sido aprobado para la detección directa de *M. tuberculosis* de muestras extrapulmonares. Aunque toda esta tecnología es rápida y ha demostrado excelente especificidad, su desempeño puede variar y todavía su sensibilidad no iguala a la de los métodos basados en el cultivo, especialmente para muestras con baciloscopia negativa. Un meta-análisis reciente que analizaba la exactitud de los métodos comerciales NAATs, mostró 125 estudios que analizaban muestras con frotis positivos, y determinó que había un alto grado de variabilidad en la exactitud entre

los estudios (9). Este análisis concluye que existe la necesidad de mejorar la exactitud de los NAATs, particularmente la sensibilidad y que NAATs comerciales no pueden ser recomendados para reemplazar el cultivo y la microscopía para el diagnóstico de TB pulmonar (8, 9).

La amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop-Mediated Isothermal Amplification)

Otro ejemplo de NAAT comercial, y que ha sido diseñado recientemente, es la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop-mediated Isothermal Amplification). La experiencia en investigación de este test es limitada. Este método se fundamenta en la nueva plataforma loop-mediated isothermal amplification (LAMP) de Eiken Chemical Co. en Japón. Esta tecnología amplifica un ADN diana bajo condiciones isotérmicas (alrededor de 65°C) y está diseñado para detectar visualmente ADN de muestras clínicas, en menos de dos horas y con un mínimo de instrumentación. No hay la necesidad de un paso previo de desnaturalización de la doble cadena a su forma simple. La amplificación y detección del ADN se dan en el mismo microtubo. (Figura 1). El relativamente complejo proceso de amplificación se detalla en el sitio web de Eiken, en el que también se incluye una animación de la reacción (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>). Un grupo experto de la OMS concuerda en que la tecnología LAMP tiene potencial para ser una herramienta diagnóstica rápida de TB, pero que la evidencia disponible de este ensayo es insuficiente para recomendarlo como prueba que sustituya a la microscopía tradicional. Actualmente, en 14 sitios, la OMS conduce estudios independientes para probar el ensayo TB LAMP, evaluando su factibilidad y costo-efectividad. Los resultados se esperan en el año 2015 (10).

Figura 1 Reacciones positivas para LAMP



Reacciones positivas para LAMP se muestran en los dos tubos de la derecha. Amplificación y detección de ADN se dan en mismo tubo. Los dos tubos de la izquierda son negativos. La imagen se tomó bajo luz UV y la fluorescencia se debe a la adición de PicoGreen a todos los tubos, un colorante que se liga al ADN, el cual se integrará al producto amplificado. Este complejo colorante-ADN emitirá fluorescencia bajo luz UV, lo cual hace fácil distinguir entre reacciones positivas y negativas. Adaptado de: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/lamp_assay.html.

El Xpert MTB/RIF test para el diagnóstico de TB resistente a drogas

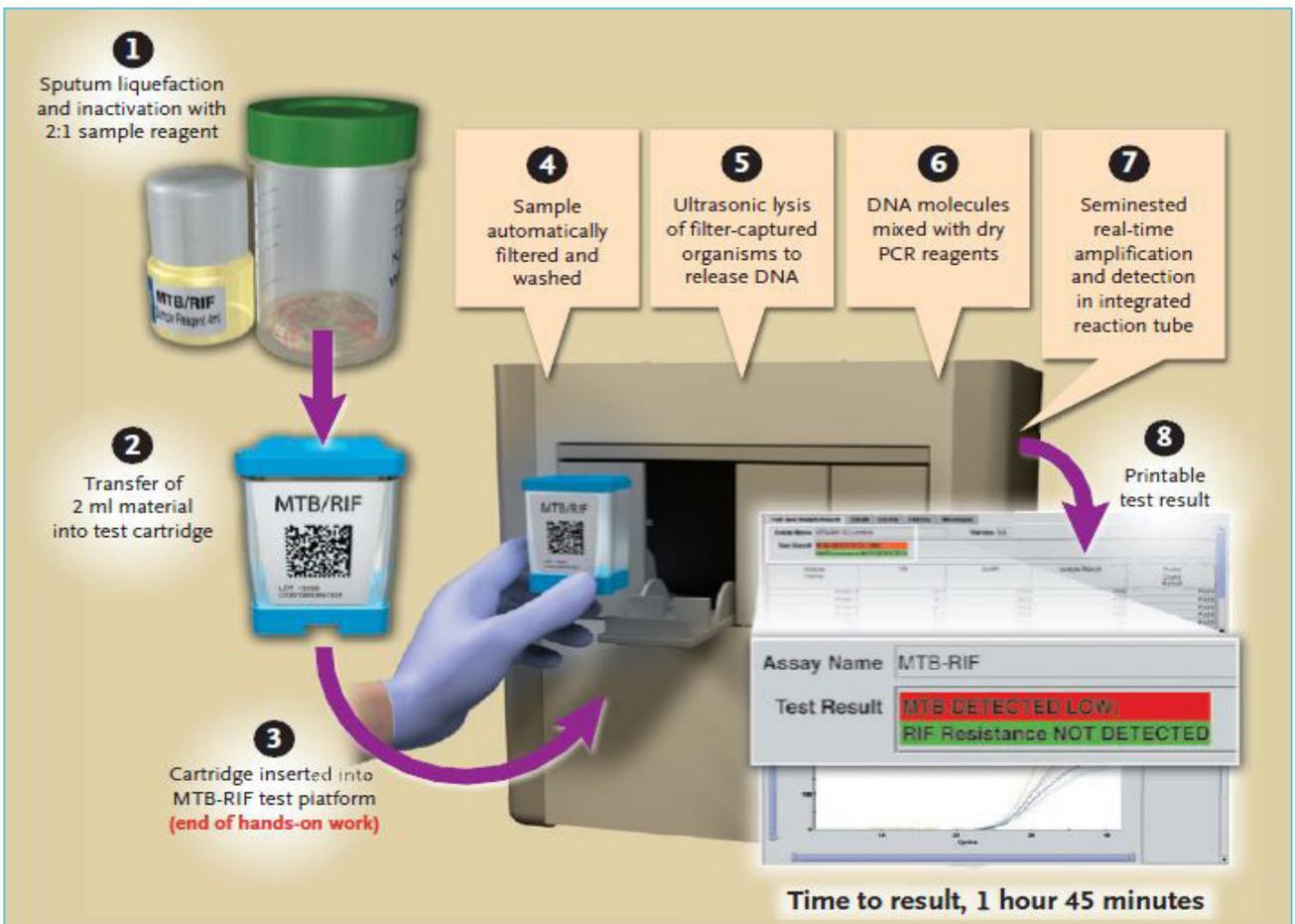
Los métodos NAATs disponibles para la detección de ADN de *M. tuberculosis*, incluyen procesamiento de la muestra de esputo y extracción del ADN como dos pasos separados. El Xpert MTB/RIF integra procesamiento del esputo, extracción de ADN y amplificación en un solo paso de preparación de la muestra (Figura 2). Este método automatizado basado en cartuchos detecta directamente del esputo y en menos de dos horas, simultáneamente el complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina. La tecnología se basa en la plataforma GeneXpert (11). Esta plataforma posibilita la detección de resistencia a la rifampicina a través de la detección de mutaciones en el gen *rpoB*. El sistema cerrado de esta tecnología, disminuye el riesgo de contaminación y no son necesarias instalaciones de bioseguridad especiales. Una revisión sobre la precisión de este método y que incluye 27 estudios, concluye que en comparación con la microscopía, el Xpert® MTB/RIF incrementa la

detección de TB entre casos confirmados por cultivo en un 23%. Para la detección de resistencia a la rifampicina, el Xpert® MTB/RIF muestra una sensibilidad acumulada de 95% y una especificidad acumulada de 98% (12). La OMS recomendó en diciembre del 2010, el uso del Xpert® MTB/RIF y en la actualidad, está promoviendo la introducción global de esta tecnología. Con la finalidad de facilitar el acceso a esta tecnología, el sector público de ciertos países puede adquirir los cartuchos a precios significativamente reducidos. Hasta el 31 de diciembre del 2014, cerca de 4,000 GeneXpert instrumentos y más de 10 millones de cartuchos MTB/RIF han sido adquiridos por el sector público de 116 de los 145 países elegidos para acceder a ese beneficio (13).

SERODIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

La detección de anticuerpos contra *M. tuberculosis* en suero, serodiagnóstico, podría ofrecer resultados rápidos a bajo costo, pero desafortunadamente, los tests de los que se dispone

Figura 2 Procedimiento para la tecnología MTB/RIF



De: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/automated_naot.html

actualmente tienen aplicación limitada, debido a la reacción cruzada y baja sensibilidad.

La detección de anticuerpos es relativamente simple y es un método costo - efectivo, pero recientes meta-análisis y revisiones sistemáticas concluyen que las pruebas serológicas comerciales disponibles, proveen resultados inconsistentes (14). La OMS actualmente no aprueba su uso para el diagnóstico de TB pulmonar ni extrapulmonar (15). Más investigación es necesaria para desarrollar tests basados en la respuesta inmune o en el serodiagnóstico y que tengan un desempeño adecuado.

DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN LATENTE POR *M. TUBERCULOSIS*

Personas con infección latente por TB están infectadas por *M. tuberculosis* pero no tienen la enfermedad. Alrededor del 30% de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y hasta hace poco, esto podía ser detectado con el test de la tuberculina (TST, del inglés, tuberculin skin test), también llamado test de Mantoux. Este test se hace inyectando intradérmicamente una pequeña cantidad de proteína derivada purificada de *M. tuberculosis* (PPD, del inglés, purified protein derivative) en la piel de la parte interna del antebrazo. Si ha habido

exposición previa a *M. tuberculosis*, una induración se desarrollará en el sitio de la inyección dentro de 2 días.

El test no diferencia entre infección latente y enfermedad activa y sus limitaciones, incluyendo la baja sensibilidad y especificidad, han sido bien documentadas. Resultados falsos positivos en el TST pueden resultar por contacto con micobacterias no tuberculosas o vacunación con el Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), debido a que la PPD, una preparación de proteína cruda, contiene antígenos que están también presentes en BCG y en ciertas micobacterias no tuberculosas (16, 17). Sin embargo, el test en piel todavía permanece como el más empleado para identificar la infección de TB o el estado inmunológico del paciente frente a la infección.

Reconocer que el interferón gamma (IFN- γ) tiene un papel crítico en regular la respuesta inmune mediada por células, frente a la infección por *M. tuberculosis*, condujo al desarrollo de pruebas alternativas para la detección de la infección de TB; ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs, del inglés, IFN- γ - release assays). IGRAs consisten en tests in vitro en sangre que mide la respuesta inmune mediada por células; de hecho se mide la liberación de interferón (IFN- γ) por las células T luego de la estimulación de una muestra del sangre del paciente con antígenos específicos de TB, ESAT-6 y CFP-10, únicos para *M. tuberculosis*. En otras palabras, IGRAs detecta la sensibilización a *M. tuberculosis* midiendo la liberación de IFN- γ en respuesta a antígenos representativos de *M. tuberculosis*. Hay dos IGRAs disponibles comercialmente; Quantiferon TB Gold tests, Cellestis, Victoria, Australia y T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, Abington, UK. Varios estudios publicados han demostrado un mejor desempeño de estos tests sobre el TST en el diagnóstico de infección por *M. tuberculosis* (18). A pesar de la evidencia de estos estudios, el no tener un estándar de referencia para la infección, hace difícil acceder a la verdadera

exactitud de estos ensayos. IGRAs no puede distinguir entre infecciones de TB activas y latentes y no debería ser usado para el diagnóstico de TB activa.

Identificación de especies de *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* comprende más de 150 especies y varias nuevas especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) patogénicas han sido descritas en los últimos 20 años. Aunque la mayoría de casos de TB a nivel mundial son causados por *M. tuberculosis*, cada especie del complejo *M. tuberculosis* puede causar tuberculosis en humanos; por ejemplo *M. bovis* transmitido por el ganado o *M. caprae* por las cabras. Las especies de MNT más frecuentemente asociadas con enfermedad pulmonar son *M. avium*, *M. kansasii* y *M. abscessus* y en algunos países infecciones por MNT han sido más importantes que la misma TB (19). Desde el punto de vista epidemiológico y debido a que el tratamiento difiere dependiendo de la especie de micobacteria, la identificación en el laboratorio clínico es definitivamente importante.

Tradicionalmente, las micobacterias fueron identificadas por métodos fenotípicos, basado en el cultivo, tales como características morfológicas, tasas y temperaturas de crecimiento, pigmentación y una serie de pruebas bioquímicas como la acumulación de niacina (*M. tuberculosis*), reducción de nitratos, hidrólisis de Tween 80, actividad de arilsulfatasa y ureasa e ingesta de hierro. Sin embargo, la identificación por estos métodos es laboriosa, consume tiempo e implica riesgo biológico, sumado a que una incorrecta identificación puede ocurrir, ya que diferentes especies pueden tener perfiles morfológicos y bioquímicos no distinguibles.

Identificación basada en la tecnología ADN

En la última década, métodos moleculares han sido desarrollados para la rápida y fiable identificación de especies de micobacterias. Un

método relativamente fácil se basa en el PCR y análisis de enzimas de restricción (PRA, del inglés, PCR and restriction enzyme analysis) de los genes codificados por la proteína de shock térmico *hsp65* (20). Este gen está presente en todas las especies de micobacterias, y los patrones generados por dos enzimas (*HaeIII* y *BstEII*) de un producto de PCR de 439 pares de bases del gen *hsp 65*, pueden ser comparados con patrones disponibles en la base de datos para la identificación de especies; también llamado sitio PRA, con perfiles para casi todas las especies micobacterianas (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

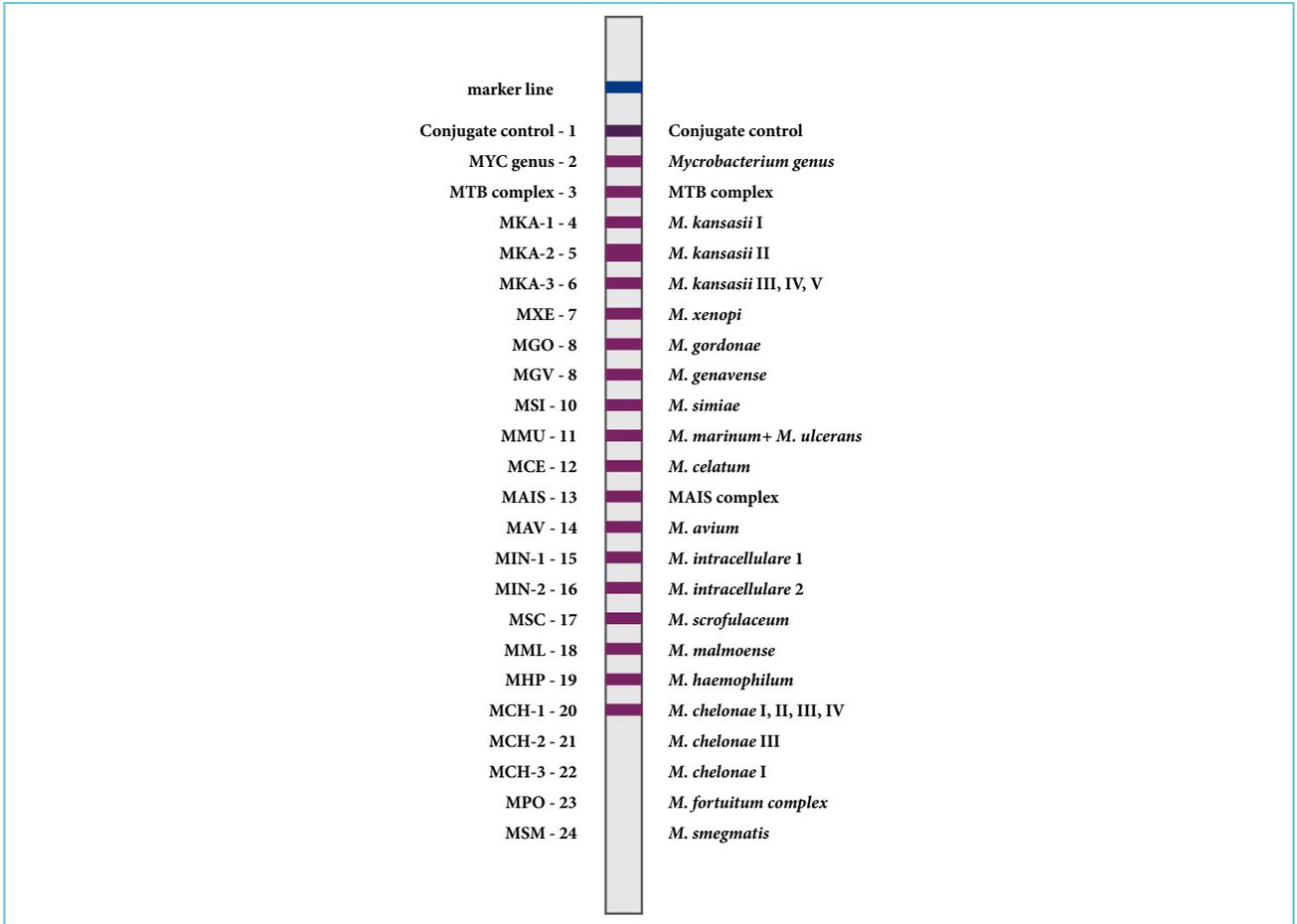
Otro método es la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal, el estándar de referencia frente al cual todos las nuevas técnicas de identificación generalmente se comparan (23). El PCR para la amplificación del gen 16S ARNr puede hacerse por métodos convencionales o con kits disponibles comercialmente como el MicroSeq 500 16S ribosomal DNA (rDNA) bacterial sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Este kit se basa en el PCR y la secuenciación de las primeras 500 pares de bases del ARNr bacteriano. El secuenciamiento puede hacerse fácil y económicamente con proveedores del servicio de secuenciación disponibles comercialmente (aproximadamente \$5 USD por secuencia). La identificación requiere una sola reacción de secuenciación, lo cual es costo-efectivo. Para la identificación final de especies, la secuencia obtenida puede ser comparada con bases de datos públicas disponibles; la base de datos EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>) o el (GenBank) del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Hay varios sistemas comerciales disponibles para la identificación de micobacterias. El primer método disponible fue el AccuProbe (Gen- Probe Inc.), basado en sondas de ADN

específicas con un marcador quimioluminiscente que se hibridiza al ARN ribosomal del organismo blanco. El test es fácil de realizar y hace posible una identificación rápida. Los resultados son leídos con un luminómetro. Test individuales para la identificación de varias importantes micobacterias están disponibles, incluyendo el complejo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, el complejo *M. avium*, *M. kansasii* y *M. goodnae*.

Más reciente es la introducción de otros sistemas moleculares para la rápida identificación del complejo *M. tuberculosis* y MNT: el INNO- LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics NV, Ghent, Belgium), y el GenoType MTBC and GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifesciences, Nehren, Germany). Estos tests son también llamados ensayos de sonda de línea reversa (reverse line blot assay en inglés) y detectan la presencia de ciertos loci de ADN, representativos de especies, en un ensayo de hibridización con un producto de PCR del microorganismo aislado. (Figura 3). INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 es un ensayo de sonda de línea que simultáneamente detecta e identifica el complejo *M. tuberculosis* y 16 diferentes especies micobacterianas. El test se basa en diferencias de nucleótidos en la región espaciadora 16S-23S ARNr y puede ser realizado a partir de un cultivo en medio sólido o líquido. El GenoType MTBC y el GenoType Mycobacterium CM and AS son también ensayos de sonda de línea. El GenoType MTBC pretende la diferenciación de miembros del complejo *M. tuberculosis*, incluyendo *M. bovis* BCG. El GenoType Mycobacterium CM and AS pueden identificar 40 de las especies más comunes de MNT, incluyendo al complejo de *M. tuberculosis*. El GenoType Mycobacterium CM permite la identificación genética molecular simultánea del complejo *M. tuberculosis* y de 24 de las especies de MNT más comunes, mientras que el GenoType Mycobacterium

Figura 3 Diseño de una tira de ensayo de sonda de línea reversa: EI INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 test



En la tira están covalentemente unidos, en líneas paralelas, 23 sondas de oligonucléotidos, que representan regiones específicas de ADN de diferentes especies de MNT y cepas del complejo *M. tuberculosis*. Algunas especies como *M. kansasii* y *M. chelonae* tienen más de una sonda en la tira porque estas especies tienen más de un tipo de secuencia de una región específica. Un producto de PCR marcado de la micobacteria de prueba, es incubado con la tira y se permite la hibridización contra secuencias homólogas, lo que se evidencia con una banda visible de hibridización en la tira.

AS identifica 19 especies adicionales de MNT. En general, los métodos moleculares ofrecen varias ventajas sobre las técnicas convencionales para la rápida detección e identificación de cepas del complejo *M. tuberculosis* y de otras micobacterias, como son el corto tiempo para tener resultados (5-48 horas), confianza y reproducibilidad. El uso de estos métodos moleculares mejora el manejo del paciente y han sido recomendados por la OMS.

Identificación basada en inmunocromatografía

Tres ensayos rápidos inmunocromatográficos han sido desarrollados para diferenciar entre cepas del complejo *M. tuberculosis* y MNT; el BD's MGIT TBc ID, el Tauns' Capilia TB (Japan) y el SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid Test (Korea).

Los tres son ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (Figura 4). El BD y el SD Biotec detectan el antígeno MPT64, mientras que el Capilia

Figura 4 Un ejemplo de un test inmunocromatográfico de flujo lateral positivo para la identificación de cepas del complejo *M. tuberculosis* en el medio sólido Löwenstein Jensen



Adaptado de: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/rapid_speciation_test.html

detecta el antígeno MPB64; ambas proteínas secretoras específicas del complejo *M. tuberculosis*. Tanto medios sólidos como líquidos pueden ser usados como muestras, aunque el BD ha sido desarrollado para usarse con cultivos líquidos (MGIT). Si se usan cultivos sólidos, una solución tampón es requerida (24). Un control positivo interno es incluido para validar la prueba. El tiempo de lectura es de 15 minutos y no se requiere de equipamiento especial. Este test ha mostrado ser altamente sensible (> 95%) y específico (> 95%) en varios estudios clínicos (24).

TEST DE SENSIBILIDAD A DROGAS (TSD, DEL INGLÉS, DRUG SENSITIVITY TESTING)

El surgimiento y diseminación de la tuberculosis multirresistente (TB-MR) y de la tuberculosis extensamente resistente (TB-ER) son un importante problema médico y de salud pública. La TB-MR es un tipo de tuberculosis, resistente

al menos a dos de los antibióticos de primera línea, rifampicina e isoniazida. La TB-ER se define como la TB que en adición a la rifampicina e isoniazida, es resistente a cualquier fluoroquinolona y al menos a una de las tres drogas inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina). La detección temprana de la resistencia a drogas es importante y reduce el tiempo desde el diagnóstico de TB, al inicio de un tratamiento apropiado, mejorando la recuperación del paciente y también ayudando al control de la transmisión de cepas resistentes en la población. Los métodos convencionales para establecer la sensibilidad a drogas son lentos. El más usado, el método estándar de proporciones, en medio Löwenstein-Jensen o en agar Middlebrook, requiere de 4 a 8 semanas para dar resultados. El método estándar de proporciones es también llamado “método indirecto”, ya que requiere un procedimiento secuencial: aislamiento de micobacterias de las

muestras clínicas, identificación del complejo *M. tuberculosis*, y las pruebas de susceptibilidad in vitro en presencia de drogas anti-TB. En los últimos 15 años, otros métodos basados en cultivo y biología molecular han sido desarrollados y algunos de ellos son “métodos directos” en los que se usan los especímenes del paciente directamente, evadiendo el tiempo necesario para aislar *M. tuberculosis* en cultivos puros (25, 26).

Métodos no comerciales de DST basados en cultivo

Métodos basados en cultivo han sido propuestos para la detección rápida de la resistencia a drogas, propuestos para ser usados en lugares de bajo presupuesto. Entre estos métodos están la observación microscópica de la resistencia a drogas (MODS, del inglés, microscopic observation of drug susceptibility), agar de capa fina (TLA, del inglés thin layer agar), métodos colorimétricos con indicador redox (CRI, del inglés, colorimetric redox indicator) y el ensayo de nitrato reductasa (NRA, del inglés, nitrate reductase assay) (27-30). Estos métodos pueden reportar resultados de susceptibilidad 1 a 2 semanas luego de la inoculación.

En los métodos MODS y TLA, medios libres de drogas y medios que las contienen (líquidos para MODS y sólidos para TLA), son inoculados directamente con especímenes de pacientes. De esta manera no hay primero el crecimiento en cultivos puros. Los cultivos son microscópicamente examinados para el crecimiento temprano de micro-colonias. Crecimiento en el medio libre de drogas indica un cultivo positivo, y el crecimiento en ambos medios indica resistencia.

Los métodos colorimétricos con indicador redox (CRI) son métodos indirectos, de tal manera que necesitan un cultivo puro de los especímenes clínicos. Estos métodos se basan en la

reducción de un indicador adicionado al cultivo líquido en una microplaca donde el *M. tuberculosis* ha sido preincubado por varios días in vitro y frente a diferentes concentraciones de drogas. La resistencia es detectada por un cambio de color en el indicador, lo cual es proporcional al número de micobacterias viables en el medio. Entre los indicadores de crecimiento usados como indicadores redox están el azul de alamar y la resazurina.

El ensayo de nitrato reductasa (NRA) es una técnica en cultivo sólido basado en la capacidad de *M. tuberculosis* de reducir nitratos a nitritos, lo cual es detectado al adicionar un reactivo específico (Griess reagent) al medio convencional Löwenstein-Jensen (LJ) que contiene 1 mg/ml de nitrato de potasio (KNO₃). La reducción de nitrato es detectada por una reacción coloreada. Este método puede ser directo o indirecto. La prueba de resistencia se hace inoculando directamente las muestras del paciente o el cultivo puro de *M. tuberculosis* en el medio que contiene antibióticos. Una reacción coloreada en el medio libre de drogas solamente, indica un cultivo positivo y el crecimiento en ambos medios, con y sin drogas, indicaría resistencia.

Los métodos MODS, CRI y el NRA, recibieron la aprobación de la OMS, no así el TLA. Estos métodos tienen similar exactitud que los sistemas comerciales de cultivo líquido y podrían ser implementados a costos mínimos en lugares de bajos ingresos y con alta cantidad de muestras. Sin embargo, estas pruebas requieren un extenso entrenamiento del operador así como estandarización y aseguramiento de la calidad antes de su implementación (25, 26).

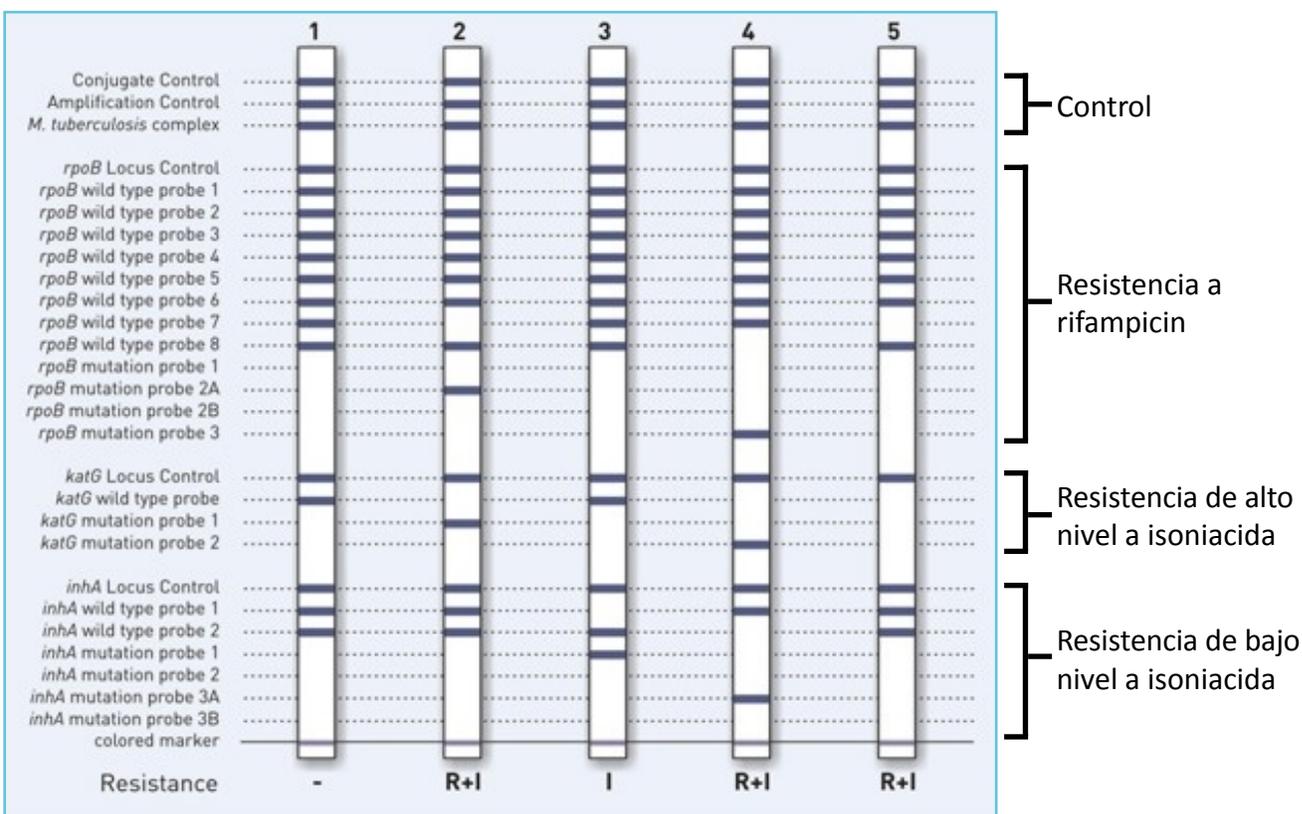
Pruebas comerciales para la susceptibilidad a drogas (DST) en cultivos líquidos

El sistema comercial de DST más comúnmente usado en cultivo líquido es el BACTEC MGIT 960 system con el kit BACTEC MGIT 960 SIRE

(Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Este es un método indirecto para probar la susceptibilidad frente a antibióticos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida). El test se hace con cultivos positivos del complejo *M. tuberculosis* inoculados en medios líquidos con las drogas y sin ellas y los resultados de susceptibilidad pueden reportarse en 1 a 2 semanas después de la inoculación. El método ha demostrado ser equivalente al método estándar de proporciones y ha sido aprobado por la FDA y promovido por la OMS. Otros sistemas automatizados de DST de *M. tuberculosis* que usan medio de

cultivo líquido incluyen el sistema Bact/ALERT MB (bioMérieux Inc., Durham, North Carolina, USA) y el VersaTREK system (Trek Diagnostic Systems, West Lake, Ohio, USA). El uso de estos sistemas comerciales, en los que se inoculan en medios de cultivo con drogas las especímenes de pacientes que fueron positivos en el frotis, potencialmente reduciría el tiempo en el que se reportan los resultados de DST en 1 - 3 semanas. Sin embargo, las “pruebas directas de susceptibilidad” de los especímenes clínicos es problemática, debido al potencial de tener bacterias contaminantes y otras especies no-tuberculosas, lo que resulta en que estos tests

Figura 5 Un ejemplo de un “reverse line blot assay”, el Genotype MTBDRplus strip



Se muestran los resultados de DST de 5 cepas del complejo *M. tuberculosis*. (1) cepa susceptible; (2) cepa resistente a rifampicina y con alto nivel de resistencia a la isoniacida; (3) cepa sensible a rifampicina y bajo nivel de resistencia a isoniacida; (4) cepa resistente a rifampicina y un alto y bajo nivel de resistencia para isoniacida; (5) cepa resistente a rifampicina y con alto nivel de resistencia a isoniacida. La tira contiene 27 bandas: 21 son para detectar mutaciones en regiones de genes asociados con resistencia (11 bandas detectan el loci del tipo salvaje y 10 bandas detectan el loci de resistencia a antibióticos). Seis bandas en la tira son bandas controles: control del conjugado, control de amplificación, control del complejo *M. tuberculosis* y los controles de amplificación del loci de los genes *rpoB*, *katG* y *inhA*.

pueden fallar hasta en un 15%. Por esta razón, la mayoría de laboratorios confían en los métodos indirectos, usando un aislamiento primario, para las pruebas de susceptibilidad.

Métodos moleculares rápidos para TSD

Mucho esfuerzo ha convocado la investigación en describir las mutaciones presentes en aquellos genes de *M. tuberculosis*, asociados con la resistencia a las drogas anti-TB. Este conocimiento ha posibilitado el desarrollo de ensayos rápidos basados en el ADN también llamados, “molecular line probe assays”, que permiten la detección simultánea del complejo *M. tuberculosis* y de las mutaciones asociadas con la resistencia a rifampicina (sola o en combinación con isoniacida). Estos ensayos se basan en el PCR, y pueden ser usados directamente con especímenes clínicos, dando resultados dentro de 24 a 48 horas; una mejora considerable en comparación al tiempo que requiere un convencional TSD, que es generalmente de 1 a 2 meses. A partir de un cultivo o una muestra clínica, positiva para *M. tuberculosis*, se amplifica por PCR la región del gen asociada a resistencia, seguido por un segundo ensayo para determinar si esta secuencia contiene mutaciones relacionadas a esa resistencia. Esto se realiza con ensayos de hibridización. Los productos de PCR marcados son hibridizados con sondas de oligonucleótidos inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa. Las mutaciones se detectan por falta de unión a las sondas de las cepas salvajes o por unión a sondas específicas para mutaciones que ocurren comúnmente (Figura 5).

Actualmente, dos ensayos comerciales de este tipo existen, el INNO-LiPA1 Rif.TB (Innogenetics, Ghent, Belgium) y el GenoType MTBDRplus® (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Germany). El LiPA detecta simultáneamente el complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina. El GenoType MTBDRplus® detecta resistencia a rifampicina así como altos y bajos niveles de

resistencia a isoniacida (Figura 5). En ambos tests, la identificación de resistencia a la rifampicina se da por la detección de mutaciones significantes en el gen *rpoB* (que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa). Para evaluar la alta resistencia a la isoniacida, el gen *katG* (que codifica para la catalasa peroxidasa) es examinado y para el bajo nivel de resistencia, se analiza la región del promotor del gen *inhA* (que codifica para la NADH enoyl ACP reductasa). Recientemente, el GenoType MTBDRs/ se ha diseñado para evaluar la resistencia a drogas anti-TB de segunda línea (fluoroquinolonas, etambutol, aminoglicósidos y péptidos cíclicos). Este test puede ser usado en combinación con el MTBDRplus para identificar TB-ER.

La OMS ha recomendado el uso del INNO-LiPA1 Rif.TB y del GenoType MTBDRplus® LiPA para el diagnóstico rápido de TB-MR en sitios con niveles altos de TB-MR. Varios estudios evalúan y demuestran que los “Line Probe Assays”, son altamente exactos en detectar TB-MR en una variedad de lugares y que son costo-efectivos cuando se comparan con el cultivo de TB y los métodos convencionales de DST (31-33).

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En las décadas pasadas, varios métodos moleculares han sido desarrollados para la detección, identificación de especies, y la evaluación rápida de la susceptibilidad a drogas de las micobacterias. Estos métodos reducen el tiempo de diagnóstico de la TB de semanas a días. Algunas técnicas son simples, pero otras son demandantes e incrementan el costo del diagnóstico considerablemente. Algunos de estos nuevos métodos, han sido recomendados por la OMS y han mostrado su potencial para mejorar significativamente la detección de casos y el manejo de pacientes, inclusive los casos de TB resistente a drogas (34,35). Sin embargo, para la mayoría de países de bajos recursos,

con altas tasas de TB, donde esta tecnología es más necesaria, es prácticamente imposible que puedan acceder a la compleja infraestructura técnica que está nueva metodología requiere. De acuerdo a reportes de la OMS, el ochenta por ciento de todos los casos mundiales ocurren en 22 países altamente poblados, la mayoría de ellos, de bajos recursos. En gran parte de estos países, el diagnóstico de TB se hace en base a la microscopía solamente, sumado a que muchos laboratorios son marginalizados por los programas de control de TB, sin personal entrenado, equipo adecuado y sin mantenimiento. Programas de aseguramiento de la calidad, ni tampoco controles externos para algunos de estos laboratorios están presentes (36). Es prioridad para estos países el mejoramiento del sistema nacional de laboratorios, para proveerlos de microscopios de alta calidad y que accedan al cultivo convencional y a los tests de susceptibilidad a drogas.

Es importante puntualizar que la nueva tecnología no puede reemplazar a los métodos estándares de diagnóstico: cultivo y el tradicional DST. El cultivo es todavía necesario para el diagnóstico de TB en pacientes con frotis negativo y el DST convencional se requiere para confirmar la resistencia detectada molecularmente. La detección molecular de la resistencia depende de la resistencia conferida por alguna mutación. Sin embargo, mecanismos alternativos de resistencia podrían desarrollarse o podrían aparecer mutaciones que no serían detectadas por el test. Para proveer resultados rápidos y confiables para el diagnóstico de TB y cuidado del paciente, se necesita de una combinación de pruebas que incluyan tinción de frotis usando microscopio de fluorescencia, métodos con medios de cultivo sólidos y líquidos, y ensayos moleculares para la identificación de TB y la detección de resistencia a drogas. Desde luego, que la implementación de todas estas herramientas en laboratorios

de rutina requiere también de sistemas apropiados de aseguramiento de la calidad.

Algunos de los principales problemas en el diagnóstico de TB no han sido resueltos con nuevas técnicas de diagnóstico. Existe todavía la necesidad de incrementar la sensibilidad en la detección de TB entre los pacientes con TB extra-pulmonar o enfermedad paucibacilar, entre pacientes inmunocomprometidos (VIH) y niños. Se requiere también de un ensayo simple y de bajo costo para usarse en centros de atención primaria, donde acuden la mayoría de pacientes con TB, pero en los que no se puede muchas veces tener acceso a un diagnóstico de la enfermedad confirmado por el laboratorio (37). Para tener un impacto en el problema de la TB en estos sitios de recursos limitados, el diagnóstico ideal sería un test sensible, específico, económicamente accesible y de realización en el punto de atención a pacientes. El progreso hacia un test de este tipo ha sido limitado, pero tal vez en un futuro cercano el descubrimiento de nuevos biomarcadores que puedan ser medidos en el sitio de atención, hará posible un diagnóstico exacto de TB con un simple test en tiempo-real. Varias pruebas para TB en el punto de atención, incluyendo ensayos serológicos mejorados, aditamentos moleculares manuales, ensayos basados en la respiración para la detección de compuestos orgánicos volátiles en el paciente enfermo, tecnologías con microchips y tests basados en proteómica y metabolómica, están bajo investigación (34, 37). A medida que la tecnología avanza, nuevas pruebas para TB y TB resistente estarán disponibles en el mercado y cuando la competencia aumente, sus precios deberían reducirse significativamente, haciéndolas accesibles para países donde los recursos son limitados y el presupuesto para la salud está lejos de ser el ideal.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Global tuberculosis report 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed Sept 12, 2015).
2. Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselning AC, Beyers N, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis* 2008;47: 203–207.
3. Hanscheid T The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102: 520–521
4. Somoskövi A, Ködmön C, Lantos A, Bártfai Z, Tamási L, Fűzy J, Magyar P. Comparison of recoveries of *mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2395-2397.
5. Heifets L, Linder T, Sanchez T, Spencer D, Brennan J. Two liquid medium systems, mycobacteria growth indicator tube and MB redox tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1227-1230.
6. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4167-4170.
7. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, Scagnelli M, Rigon A, Ruggiero G, Goglio A. Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):651-657.
8. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*2000;49:593–594.
9. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One.* 2008;3(2):e1536.
10. The use of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay (TB-LAMP) for the detection of tuberculosis. 2013. WHO/HTM/TB/2013.05. Geneva. Retrieved from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/83142/1/WHO_HTM_TB_2013.05_eng.pdf.
11. Cepheid GeneExpert Systems. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/systems/genexpert-systems/genexpert-i>.
12. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 21;1- 161.
13. World Health Organization. TB diagnostics and laboratory strengthening. Retrieved from: <http://who.int/tb/laboratory/mtbrifrollout/en/>.
14. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2011; 8: e1001062.
15. World Health Organization. Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.5. Geneva, Switzerland: WHO, 2011.
16. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002; 57: 804-809.
17. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10: 1192-1204
18. Centers for Disease Control and Prevention. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States, 2010. *MMWR* 2010;59(1-25)
19. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):13-34.
20. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):175-178.
21. Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2882-2889.
22. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth S, Levin M, Scott JA. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid culture. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4343-4346.
23. Palomino JC, Vandamme P, Martin A. Classical and new assays for detecting drug resistance in tuberculosis. *Biomark Med.* 2014;8(9):1105-1114.
24. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(2):103-111.
25. Minion J, Leung E, Menzies D, Pai M. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(10):688-698.

26. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(1): 56-64.
27. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(2):175-183.
28. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(4):500-505
29. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 1-9
30. Ling D, Zwerling A, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis, *Eur Respir J.* 2008; 32: 1165–1174
31. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy, *Expert Review of Respiratory Medicine* 2008;2(5):583-588.
32. Boehme CC, Saacks S, O'Brien RJ. The changing landscape of diagnostic services for tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2013;34(1):17-31
33. Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):772-776.
34. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, Spector S, Roscigno G, Nkengasong J. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):314-350.
35. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis.* 2012;15;205 Suppl. 2:S147-58.