

Valoración clínica de la prueba *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct 2* (AMTD-2, GenProbe) en el diagnóstico rápido de la tuberculosis

Fernando Artiles, María José Pena, María Isolina Campos-Herrero y Bernardo Lafarga

Servicio de Microbiología. Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria.

OBJETIVO. Evaluar la rentabilidad del *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test 2- Gen-Probe* (AMTD-2) en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras con baciloscopia negativa.

PACIENTES Y MÉTODOS. Desde enero a diciembre de 1999, se incluyeron en el estudio 683 muestras, 333 respiratorias y 350 no respiratorias, de 457 pacientes. Se incluyeron todas las muestras de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las muestras respiratorias de los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar (al menos dos por paciente) y todas las muestras no respiratorias. Como método de referencia diagnóstica se consideró el aislamiento en cultivo. En los casos discordantes se revisaron los datos clínicos y se consideró como criterio de referencia el diagnóstico clínico final. La frecuencia de realización de la técnica fue de una vez por semana.

RESULTADOS. Los resultados de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo respecto al cultivo fueron 58,9%, 93,9%, 37,1% y 97,4% respectivamente. Después del análisis de las discrepancias, estos resultados fueron 70,4%, 97,7%, 73,1% y 96,8% respectivamente. En muestras respiratorias fueron 67,6%, 98,6%, 86,2% y 95,9% y en muestras no respiratorias 76,5%, 96,9%, 56,5% y 98,7% respectivamente. Los tiempos medios de diagnóstico por cultivo y por AMTD-2 fueron 20,3 días (rango: 10-63 días) y 5,75 días (rango 2-20 días) respectivamente.

CONCLUSIONES. El AMTD-2 es un método rápido de diagnóstico cuando los datos clínicos son compatibles con una tuberculosis activa. Sin embargo, debido al bajo valor predictivo positivo ante un único resultado positivo en una muestra de un paciente sin una clínica sugestiva, sería conveniente obtener muestras sucesivas para confirmar el resultado.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, AMTD-2, muestras respiratorias, muestras no respiratorias.

Correspondencia: Dra. M^ªJ. Pena López
Servicio de Microbiología
Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín
Barranco de la Ballena s/n
35020-Las Palmas de Gran Canaria
mjpena@correo.hpino.rcanaria.es

Manuscrito recibido el 19-7-2000; aceptado el 7-11-2000.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 53-56

Clinical evaluation of the *Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct 2* test (AMTD-2, GenProbe) for rapid diagnosis of tuberculosis

OBJECTIVE. To evaluate the performance of the *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test 2- Gen Probe* (AMTD- 2) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples.

PATIENTS AND METHODS. From January to December 1999, 683 specimens, 333 respiratory and 350 non-respiratory ones collected from 457 patients, were included in the study. All the samples of HIV-positive patients, the respiratory samples from patients suspected of having pulmonary tuberculosis (at least two by patient) and all non-respiratory samples were included. As diagnosis method of reference, the culture isolation was considered. Clinical data were analyzed in case of discrepant results and clinical diagnosis was considered the reference criteria. The technique was performed once a week.

RESULTS. The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of this assay were 58.9%, 93.9%, 37.1% and 97.4% respectively related to the standard culture. When referred to clinical diagnosis of active tuberculosis, these values improved to 70.4%, 97.7%, 73.1% and 96.8% respectively (in respiratory samples were 67.6%, 98.6%, 86.2% and 95.9% and in nonrespiratory ones 76.5%, 96.9%, 56.5% and 98.7% respectively). The mean time of diagnosis by culture and by AMTD-2 were 20.3 days (range 10-63) and 5.7 days (range 2-20) respectively.

DISCUSSION. It is concluded that AMTD-2 is a rapid diagnosis method when clinical data are suggestive with active tuberculosis. However, due to the low positive predictive value, it would be convenient to obtain successive samples to confirm the result in patients without clinical evidence of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* AMTD-2 respiratory samples, nonrespiratory samples.

Introducción

La detección precoz del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas es esencial en el control y prevención de la tuberculosis¹, debido a que la rapidez en la identificación de los individuos enfermos y en la instauración de un tratamiento efectivo reducirá la transmisión de la enfermedad.

Tradicionalmente, el diagnóstico de laboratorio se ha basado en el examen directo mediante tinciones ácido-alcohol resistentes y en el aislamiento en medios de cultivo. La baciloscopia es un método rápido, pero presenta baja sensibilidad cuando se realiza a partir de muestras paucibacilares². En cuanto al cultivo, a pesar de que actualmente se utilizan medios líquidos más rápidos, se requiere un tiempo medio superior a 11-13 días para detectar un positivo a partir de muestras con baciloscopia positiva y de al menos 15-20 días a partir de muestra con baciloscopia negativa^{3,4}. Además, la rentabilidad diagnóstica es baja en ciertas situaciones⁵⁻⁷.

Por ello, en los últimos años se han desarrollado técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que permiten realizar de forma rápida un diagnóstico específico del complejo *M. tuberculosis* con buena sensibilidad⁸⁻¹¹.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la rentabilidad de uno de estos métodos, el *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test 2- Gen-Probe* (AMTD-2) en el diagnóstico de rutina de la tuberculosis en pacientes adultos cuyas muestras fueron negativas por tinción.

Pacientes y métodos

Desde enero hasta diciembre de 1999 se incluyeron en el estudio 683 muestras, 333 respiratorias (277 esputos y 56 muestras obtenidas por fibrobroncoscopia) y 350 no respiratorias (106 líquidos ceforraquídeos [LCR], 94 pleurales, 30 articulares, 29 ascíticos, 5 pericárdicos, 18 aspirados de adenopatías, 18 colecciones purulentas, 9 orinas, 8 aspirados de médula ósea y 33 biopsias obtenidas de diferentes localizaciones) de 457 pacientes. Se incluyeron todas las muestras de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las muestras respiratorias de los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar (al menos dos por paciente) y todas las muestras no respiratorias en los casos en los que se solicitó descartar un diagnóstico de tuberculosis. Se eliminaron los pacientes con muestras con baciloscopia positiva.

En todas las muestras se realizó examen directo mediante tinción de auramina y/o Ziehl-Neelsen y cultivo en medio líquido (BACTEC-MGIT 960-Becton Dickinson) después de digestión-descontaminación por el método de la N-acetilcisteína-NaOH. Los líquidos estériles, las biopsias y los aspirados de adenopatía y médula ósea se cultivaron además en medio de Löwenstein-Jensen con y sin piruvato. Todos los cultivos se incubaron 8 semanas. La identificación del complejo *M. tuberculosis* se realizó mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos (AccuProbe, Gen-Probe). La prueba AMTD-2 se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, con una periodicidad de una vez por semana. De forma resumida, 450 µl de las muestras descontaminadas diluidas en 50 µl de tampón de dilución de muestras se sonicaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la amplificación, se añadieron 25 µl del lisado a un tubo de amplifi-

cación con reactivo de amplificación reconstituido, se incubó a 95°C durante 15 minutos y, posteriormente, se enfrió a 42°C durante 5 minutos. A continuación se añadieron 25 µl de una mezcla de reactivo enzimático y se incubó durante 30 minutos-1 hora a 42°C. Para la detección se añadieron a cada tubo 100 µl de sonda marcada con éster de acridina y se incubó a 60°C durante 5 minutos más. La lectura se realizó en un luminómetro. El punto de corte para considerar una muestra positiva fue 30.000 unidades relativas de luz (URL).

Como método de referencia diagnóstica se consideró el aislamiento en cultivo. En los casos discordantes se revisaron los datos clínicos y radiológicos y se consideró como criterio de referencia el diagnóstico clínico final.

Para el análisis de los resultados se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del método AMTD-2 para diagnóstico de tuberculosis en los diferentes tipos de muestras.

Resultados

De las 683 muestras incluidas en el estudio, 39 muestras (5,7%) de 24 pacientes desarrollaron cultivo positivo, 30 respiratorias (9,0%) y 9 no respiratorias (2,5%). En cuatro pacientes las baciloscopias fueron positivas en muestras recibidas con posterioridad. El tiempo medio de diagnóstico por cultivo fue 20,3 días (rango: 10-63 días).

Durante el período de tiempo del estudio hubo 7 muestras respiratorias con baciloscopia negativa y cultivo positivo que no fueron incluidas basándose en los criterios citados.

Sesenta y dos muestras (9,1%) de 47 pacientes fueron AMTD-2 positivo, 34 respiratorias (10,2%) y 28 no respiratorias (8,0%).

Los resultados obtenidos mediante AMTD-2 y su relación con el cultivo se muestran en la tabla 1. Los resultados globales de S, E, VPP y VPN fueron 58,9%, 93,9%, 37,1% y 97,4% respectivamente. En muestras respiratorias fueron 60%, 94,7%, 52,9% y 95,9% y en muestras no respiratorias 55,5%, 93,2%, 17,8% y 98,7% respectivamente.

Al analizar las discordancias 16 muestras (8 respiratorias y 8 no respiratorias) fueron consideradas verdaderos positivos, por lo que 38 muestras de 25 pacientes fueron verdaderos positivos, mientras que 14 muestras (4 respiratorias y 10 no respiratorias) de 12 pacientes fueron consideradas falsos positivos. En 10 pacientes el diagnóstico clínico final no fue concluyente, por lo que se excluyeron del análisis; 16 muestras (12 respiratorias y 4 no respiratorias) de 11 pacientes fueron falsos negativos.

Los resultados del AMTD-2 con respecto al criterio diagnóstico final se muestran en la tabla 2. Los resultados globales de S, E, VPP y VPN del método AMTD-2 fueron: 70,4%, 97,7%, 73,1% y 96,8% respectivamente. En muestras respiratorias fueron 67,6%, 98,6%, 86,2% y 95,9% y en muestras no respiratorias 76,5%, 96,9%,

TABLA 1. Resultados del test AMTD-2 en comparación con el cultivo

Tipo de muestra	Cultivo(+) AMTD-2 (+)	Sólo AMTD-2 (+)	Sólo cultivo (+)	Cultivo (-) AMTD-2 (-)	Total
Respiratoria	18	16	12	287	333
No respiratoria	5	23	4	318	350
Total	23	39	16	605	683

(+): positivo; (-) negativo

TABLA 2. Resultados del test AMTD-2 en comparación con el diagnóstico clínico

Tipo de muestra	AMTD (+) y Cultivo (+) y/o TBC ¹	Sólo AMTD-2 (+) sin TBC ¹	Sólo Cultivo (+)	Cultivo (-) AMTD-2 (-)	Total
Respiratorias	25	4	12	287	328
No respiratorias	13	10	4	318	345
Total	38	14	16	605	673

TBC: evidencia de enfermedad tuberculosa. (+): positivo; (-): negativo

56,5% y 98,7% respectivamente.

El tiempo medio de diagnóstico por AMTD-2 fue de 5,8 días (rango 2-20 días).

En la tabla 3 se muestran los resultados del total de positivos, verdaderos positivos y falsos positivos por tipo de muestra. Dos resultados considerados falsos positivos (un LCR y un líquido pericárdico) presentaron un exceso de sangre.

La absorbancia media en las muestras con resultado falso positivo fue de 601.042 URL (rango: 33.879-2.407.427) y con resultado verdadero positivo 1.017.867 URL (rango: 47.819-3.332.341).

Discusión

La necesidad de métodos rápidos y seguros para el diagnóstico de la tuberculosis ha propiciado el continuo desarrollo de técnicas de amplificación genómica. Su evaluación frente a los métodos clásicos es necesaria a la hora de introducir dichas técnicas para su uso clínico rutinario. Esta necesidad es más patente si se pretende diagnosticar la enfermedad en pacientes con un cuadro clínico y/o radiológico atípico, como en los casos de tuberculosis extrapulmonar o diseminada.

En una zona de baja prevalencia de infección por micobacterias no tuberculosas como la muestra, la baciloscopia ha mostrado ser un método específico y rápido de diagnóstico de tuberculosis. No obstante, las muestras paucibacilares requieren casi siempre un diagnóstico más lento por cultivo.

Los resultados de los estudios que evalúan los distintos métodos de amplificación disponibles varían dependiendo

del tipo de muestra que se procese, del resultado de la baciloscopia y de la metodología utilizada¹²⁻¹⁴. La utilidad clínica de estos métodos, en algunas circunstancias, resulta controvertida¹⁵.

En este estudio evaluamos el método AMTD-2, una técnica de amplificación enzimática isotérmica de ARNr específico del complejo *M. tuberculosis*, en el uso rutinario en un laboratorio asistencial, en muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa.

Los resultados de S y E encontrados son similares a los descritos por otros autores^{16,17}. La S del AMTD-2 en nuestro estudio fue del 70,9%. Los resultados falsos negativos pueden deberse a inhibición de la RNA polimerasa del AMTD-2 con sustancias contenidas en las muestras o bien a una pérdida de microorganismos debido a la variabilidad en el muestreo y a los pequeños volúmenes de muestra que se procesan. La S podría mejorar si fuese posible en una única reacción determinar la presencia de inhibidores en la muestra mediante la utilización de un control interno de amplificación. Además, el tratamiento con N-acetilcisteína-NaOH reduce la presencia de inhibidores hasta en un 80% de las muestras¹⁸.

En nuestro estudio uno de los resultados más destacables es el bajo VPP, principalmente en muestras no respiratorias. Aunque algunos autores han descrito VPP también bajos^{12,19}, en otros estudios este resultado se aproxima al 100%^{17,20}. Las posibles causas de aparición de estos resultados falsos positivos se han justificado por las contaminaciones de laboratorio, de forma que en laboratorios asistenciales en donde se trabaja con un elevado número de muestras, las contaminaciones pueden ser mayores²¹. Sin embargo, es destacable que en nuestro

TABLA 3. Resultados positivos (verdaderos y falsos positivos) del AMTD-2 según el tipo de muestra

Tipo de muestra	Nº Total de muestras	Total positivos AMTD-2 (Nº/%)	Verdaderos positivos (Nº/%)	Falsos positivos (Nº/%)
Muestras respiratorias				
Espuito	277	26(9,4)	22(84,6)	4(15,4)
Muestra obtenida por fibrobroncoscopia	56	3(5,3)	3(100)	—
Total	333	29(8,8)	25(86,2)	4(13,8)
Muestras no respiratorias				
LCR	106	4(3,8)	1(25,0)	3(75,0)
L. pleural	94	3(3,2)	1(33,3)	2(66,6)
L. articular	30	2(6,7)	—	2(100)
L. ascítico	29	0	—	—
L. pericárdico	5	4(80,0)	3(75,0)	1(25,0)
Aspirado de adenopatía	18	3(16,7)	3(100)	—
Colección purulenta	18	0	—	—
Orina	9	1(11,1)	—	1(100)
Aspirado de médula ósea	8	5(62,5)	5(100)	—
Biopsia	33	1 (3,0)	—	1(100)
Total	350	23 (6,6)	13(56,5)	10(43,5)

Nº: número; LCR: líquido cefalorraquídeo; L.: líquido

estudio el número de falsos positivos sea significativamente mayor en muestras no respiratorias que en respiratorias, por lo que no creemos que la contaminación sea la principal o única causa de aparición de estos resultados. Se ha descrito que la aparición de falsos positivos puede deberse a la quimioluminiscencia inespecífica de fondo debido a las impurezas de sangre de las muestras^{19,22}. En estudios en donde la muestra se somete a procesos adicionales de lavado para eliminar contenido hemorrágico o cuando se descontamina con el método del dodecil sulfato sódico (SDS), en los que la muestra se somete a procesos de lavado para eliminar los restos del SDS, los VPP mejoran¹⁷. Con posterioridad a este trabajo, hemos observado que la muestras con restos de sangre después del proceso de digestión-descontaminación producen reacciones positivas inespecíficas en la mayoría de los casos (datos no publicados).

Creemos que los resultados de S son buenos, ya que el método permite el diagnóstico de más del 65% de las tuberculosis con baciloscopia negativa; sin embargo, debido al bajo VPP, ante un único resultado positivo en una muestra de un paciente sin una clínica sugestiva, sería conveniente repetir el test y obtener muestras sucesivas, si es posible, para confirmar el resultado; en caso de no ser posible es necesario esperar el resultado del cultivo. Asimismo, las muestras con exceso de sangre deberían someterse a un proceso adicional de lavado para disminuir los falsos positivos y negativos. Como conclusión, creemos que el AMTD-2 complementa al diagnóstico microbiológico convencional y puede constituir un método rápido de diagnóstico cuando los datos clínicos son compatibles con una tuberculosis activa.

Bibliografía

1. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good RC. The resurgence of tuberculosis. Is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31: 767-770.
2. Chapin K. Clinical microscopy. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology* (6th ed.) Washington DC: American Society for Microbiology, 1995; 33-51.
3. Somoskovi A, Kodmon C, Lantos A, Bartfai Z, Tamasi L, Fuzy J, et al. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 System. The BACEC 460 TB System and Löwenstein-Jensen Medium. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2.395-2.397.
4. Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N, García JM, Villar H, Rodríguez J, et al. Fully automated liquid culture system compared with Löwenstein-Jensen solid medium for rapid recovery of mycobacteria from clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 265-273.
5. Starke JR. Childhood tuberculosis: a diagnostic dilemma. *Chest* 1993; 104: 329-330.
6. Ahuja GK, Mohan KK, Prasad K, Behari M. Diagnostic criteria for tuberculous meningitis and their validation. *Tubercle Lung Dis* 1994; 75: 149-154.
7. Haas DW, Des Prez RM. *Mycobacterium tuberculosis*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of Infectious Diseases* (4th ed.) New York: Churchill Livingstone Inc. 1995; 2.480-2.517.
8. Brown TJ, Power EG, French GL. Evaluation of three commercial detection systems for *Mycobacterium tuberculosis* where clinical diagnosis is difficult. *J Clin Pathol* 1999; 52: 193-197.
9. Alonso P, Orduña A, Bratos MA, San Miguel A, Rodríguez Torres A. Clinical evaluation of a commercial ligase-based gene amplification method for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 371-376.
10. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2.853-2.860.
11. Gamboa F, Fernández G, Padilla E, Manterola JM, Lonca J, Cardona PJ, et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 684-689.
12. Bradley SP, Reed SL, Catanzaro A. Clinical efficacy of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1.606-1.610.
13. Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EMI, Welscher H, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 834-841.
14. Lang AM, Feris-Iglesias J, Pena C, Sánchez JF, Stockman L, Rys P, et al. Clinical evaluation of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2.191-2.194.
15. American Thoracic Society Workshop. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1.804-1.814.
16. Bodmer T, Gurtner A, Schopfer K, Matter L. Screening of respiratory tract specimens for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* by using the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 1994; 1.483-1.487.
17. Gamboa F, Manterola JM, Viñado B, Matas L, Giménez M, Lonca J, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 307-310.
18. Ehlers S, Ignatius R, Regnath T, Hahn H. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 1996; 2.275-2.279.
19. Vlasopolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2.699-2.703.
20. Chedore P, Jamieson FB. Routine use of the Gen-Probe MTD2 amplification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in a large public health mycobacteriology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 185-191.
21. Richeldi L, Barnini S, Saltini C. Molecular diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995; 30: 698s-700s.
22. Fairfax MR. Evaluation of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct detection Test. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 594-599.