



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

¿Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis?

What does molecular biology contribute to the diagnosis of tuberculosis?

Fernando Alcaide

Servicio de Microbiología, Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

Hace 2 décadas, la irrupción y el posterior desarrollo de las técnicas de biología molecular en el mundo de la microbiología clínica han supuesto un gran avance en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Esto ha sido especialmente relevante en todos aquellos apartados donde la metodología convencional ha evidenciado sus mayores limitaciones, como han sido el mundo de la virología y determinadas infecciones fúngicas y parasitarias. Dentro de la bacteriología, uno de los campos más notables de aplicación han sido las infecciones por micobacterias; destaca la tuberculosis (TB) que es, con mucho, una de las enfermedades infecciosas más importantes que asolan a la humanidad¹. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), en 2007 hubo en el mundo 9,2 millones de casos nuevos de TB activa y 1,7 millones de personas fallecieron por la enfermedad¹. Además, en los últimos años se ha asistido a la aparición y la diseminación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos. Aunque todo esto es especialmente grave en los países con escasos recursos económicos, los flujos migratorios masivos actuales están afectando, en mayor o menor medida, a los países más ricos del planeta. El retraso diagnóstico, tanto el de la enfermedad como el de la TB resistente a múltiples fármacos, representa uno de los mayores obstáculos para su control a escala mundial¹.

Tradicionalmente, el diagnóstico microbiológico de la TB se ha fundamentado en la baciloscopia, el cultivo y la identificación fenotípica. Si bien el método más rápido, sencillo y económico disponible es la baciloscopia, su escasa sensibilidad (del 45 al 80% de los cultivos positivos) ha limitado su utilidad, especialmente en las zonas geográficas de menor incidencia de la enfermedad y en las formas extrapulmonares (paucibacilares) de ésta. Además, hay que tener en cuenta que un porcentaje nada despreciable (17%) de la transmisión tuberculosa se debe a pacientes con baciloscopia negativa y cultivo positivo². Por otro lado, a pesar de tener una buena especificidad global, en aquellas áreas de mayor incidencia de aislamientos clínicos de micobacterias no tuberculosas (MNT), la baciloscopia tiene un valor predictivo positivo bajo (entre el 50 y el 80%)^{3–5}. Por el contrario, hoy en día el cultivo continúa siendo el método de referencia por su sensibilidad y por permitir acceder

a estudios posteriores con el aislado micobacteriano (identificación, sensibilidad y tipificación epidemiológica)^{4,5}. Sin embargo, la lentitud de crecimiento del bacilo tuberculoso representa el mayor inconveniente para un diagnóstico rápido de la enfermedad. En las 2 últimas décadas, el cultivo ha tenido un desarrollo espectacular mediante los nuevos medios y sistemas más o menos automatizados, como el Bactec 460TB[®] (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, EE. UU.), MB Bact/AlerT[®] (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, Francia), MGIT 960[®] (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, EE. UU.) y VersaTREK[®] (Trek Diagnostic System, Westlake, EE. UU.). A pesar del gran avance de estos sistemas de cultivo, aún se requieren varias semanas para alcanzar la confirmación microbiológica definitiva, y más aún con los procedimientos de identificación fenotípicos^{3–6}. Por todo esto, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico rápido de la TB activa, y los moleculares o genotípicos son la mejor alternativa.

En la actualidad hay múltiples técnicas moleculares (comerciales y caseras) y diversas aplicaciones de éstas en el campo del diagnóstico microbiológico de la TB^{4,6–9}. De esta forma, cabe distinguir entre los métodos moleculares sin amplificación genética previa y los que se basan en ella, así como los que se llevan a cabo a partir de cultivos del microorganismo o bien directamente en muestras clínicas. Estos conceptos son fundamentales a la hora de utilizar y comprender cuáles son las posibilidades y las limitaciones de estas técnicas moleculares que conduzcan a una mejor interpretación de ellas.

La primera gran innovación en la identificación molecular de aislamientos micobacterianos obtenidos por cultivo (sólidos y líquidos, incluso hemáticos) llegó a comienzos de la década de 1990 con las sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) quimioluminiscentes. Éstas permiten identificar, por hibridación con el ácido ribonucleico (ARN) ribosómico micobacteriano y sin amplificación previa, el complejo *M. tuberculosis* y otras especies de forma rápida y específica^{4,6–9}. Sus principales desventajas consisten en que no están disponibles para todas las especies patógenas, requieren una orientación presuntiva para la elección de la sonda adecuada, no detectan los cultivos mixtos y tienen algunos problemas de especificidad, como los descritos en *M. tuberculosis* con *Mycobacterium terrae* y *Mycobacterium celatum*. Sin embargo, una importante evidencia científica sobre la utilidad

Correo electrónico: falcaide@bellvitgehospital.cat

de estas sondas que han sido, y continúan siendo, uno de los modelos de referencia en la identificación micobacteriana en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados^{4,6-10}. Y esto es especialmente destacable para el complejo *M. tuberculosis*, donde se obtienen una sensibilidad y una especificidad superiores al 99%^{4,6-10}. Posteriormente, al intentar solventar algunos de los inconvenientes que presentaban las sondas, se han desarrollado nuevos métodos basados en la amplificación de secuencias de ADN específicas y son, en la actualidad, los que presentan un mayor impulso e interés. Todos ellos requieren una amplificación genómica y un posterior análisis postamplificación mediante la observación del fragmento amplificado, o bien una hibridación, restricción o secuenciación de éste. Así, dentro de la identificación habitual a partir de aislamientos obtenidos por cultivo, se están imponiendo las técnicas basadas en una hibridación en fase sólida tras la amplificación. Hay múltiples formatos comerciales y caseros más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc.) y otros más sofisticados, como los *chips* o *arrays* de ADN. Sin embargo, en la actualidad los más ampliamente utilizados son 2 productos comerciales: INNO-LiPA[®] (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) y GenoType[®] (Hain Lifescience, Nehren, Alemania). Ambos sistemas se fundamentan en la amplificación de una zona genética concreta (el espacio intergenético 16S-23S para el INNO-LiPA[®] y el 23S ADN ribosómico [ADNr] para el GenoType[®]) y posterior hibridación del producto amplificado sobre las diferentes sondas dispuestas en una tira de nitrocelulosa, que son de fácil lectura e interpretación. En los estudios realizados se ha observado que ambos sistemas son muy similares, con buena sensibilidad y especificidad a partir de cultivos tanto líquidos como sólidos, y obteniendo los resultados en una jornada laboral^{4,6-9}. Además de la variedad de especies que pueden identificarse en una sola prueba, estos métodos permiten la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Asimismo, es remarkable que el sistema GenoType[®] incluye una tira específica para la identificación de diferentes especies del complejo *M. tuberculosis*¹¹. Este diagnóstico tiene una importante utilidad epidemiológica y terapéutica en determinadas situaciones. Así, en algunas enfermedades, como el cáncer de vejiga superficial, se realizan tratamientos endocavitarios mediante instilaciones con *Mycobacterium bovis*-bacilo de Calmette y Guérin, para disminuir el número de recurrencias y mejorar el intervalo libre de enfermedad. En estos casos es necesario monitorizar la presencia de esta especie micobacteriana en la orina. Por otro lado, es bien conocido que no todas las especies del complejo *M. tuberculosis* tienen la misma sensibilidad a los antituberculosos, como en el caso de *M. bovis*, que es resistente de forma natural a la pirazinamida. En este sentido, el estudio de Herrera-León et al, publicado en este número de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, aborda la elaboración de un algoritmo de identificación rápido y sencillo de todas las especies del complejo *M. tuberculosis*, con métodos moleculares caseros (*in house*) aplicados en aislamientos obtenidos por cultivo¹². Este esquema se fundamenta en diversos estudios previos basados en la presencia o no, mediante PCR (*polymerase chain reaction* 'reacción en cadena de la polimerasa'), de unas regiones del genoma denominadas «regiones de diferencia», así como en determinados patrones de restricción (PCR-RFLP [*restriction fragment length polymorphism* 'polimorfismo del ADN']) de los genes *gyrB* y *hsp65*^{12,13}. En el estudio de Herrera-León et al se analizan las diferentes técnicas en su conjunto y se presentan, tras una evaluación detallada, una sensibilidad y especificidad del 100%, siempre y cuando se combine con alguna prueba fenotípica simple^{12,13}. Aunque la variedad, la laboriosidad y el diseño casero de las técnicas comprendidas en el esquema pueden ser una limitación para determinados laboratorios clínicos, éste representa un importante avance en la protocolización de una metodología molecular que permita el diagnóstico preciso

del agente causal de la enfermedad tuberculosa, cuando éste se requiera.

Otras posibilidades de diagnóstico molecular a partir de cultivo son la PCR-RFLP del gen *hsp65* PRC *restriction analysis* (PRA) o 16S-23S y la secuenciación del 16S ADNr, entre otros. Sin embargo, aunque estos métodos pueden identificar el complejo *M. tuberculosis*, su mayor utilidad se basa en la identificación de especies nuevas o poco frecuentes de MNT no contempladas en los sistemas comerciales de identificación^{4,6,8,9}.

Uno de los aspectos más relevantes y controvertidos sobre la aportación de la biología molecular en el diagnóstico de la TB es la detección directa de *M. tuberculosis* de la muestra clínica. Es indudable que el diagnóstico rápido (de 24 a 48 h) de la TB activa representa uno de los mayores retos en el control de la enfermedad, ya que posibilita una intervención epidemiológica (aislamiento y estudio de contactos) y tratamiento precoz, que incrementa las posibilidades de interrupción de la transmisión infecciosa. En los últimos 15 años se han desarrollado muchas técnicas moleculares (comerciales y caseras), si bien todas se fundamentan en la amplificación de secuencias genéticas (ADN o ARN) específicas del complejo *M. tuberculosis* y su posterior detección, lo que no implica necesariamente la viabilidad de la micobacteria. A pesar del ingente número de trabajos publicados hasta la fecha, no hay evidencia científica sólida, unánimes y concluyentes sobre el tema. La variedad en los diseños y métodos utilizados, así como la falta de estandarización entre los estudios, dificultan el análisis comparativo entre éstos. Además, el método de referencia microbiológico continúa siendo el cultivo, que tiene una sensibilidad teórica inferior a los métodos de amplificación de ácidos nucleicos (AAN), lo que representa un importante inconveniente para la evaluación de éstos. No obstante, hoy se sabe que estos métodos moleculares tienen un valor predictivo positivo (VPP) mayor que la microscopia (>95%) en las muestras con baciloscopia positiva en áreas geográficas con un importante número de aislamientos de MNT. Por otro lado, en las muestras con baciloscopia negativa y cultivo positivo, los métodos de AAN son capaces de confirmar de forma rápida la presencia de *M. tuberculosis* en el 50 al 80% de los casos^{7,14-16}. Además, globalmente, los métodos moleculares son capaces de detectar la presencia de *M. tuberculosis* en el 80 al 90% de los pacientes con sospecha clínica de TB pulmonar, varias semanas antes que el cultivo^{7,14,15}. Con todo, 3 aspectos parecen decisivos en la utilización e interpretación de estas pruebas de AAN: a) las técnicas empleadas: en general, aunque en la actualidad se utilizan múltiples técnicas en el diagnóstico clínico, se recomiendan las pruebas comerciales que hayan sido aprobadas por organismos o agencias oficiales. Así, la Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado 2 productos, MTD[®] (*Mycobacterium tuberculosis* direct) (Gen-Probe Incorporated, San Diego, EE. UU.) en 1995 y Amplicor[®] (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) en 1996¹⁷. En cualquier caso, se aconseja que estas pruebas se realicen según las instrucciones del fabricante o procedimientos normalizados y validados, así como la extracción automatizada de los ácidos nucleicos para, entre otras cosas, prevenir las contaminaciones cruzadas. Además, estas técnicas deberían llevarse a cabo en laboratorios con la infraestructura y la dotación adecuadas, donde realicen un número elevado de pruebas y tengan una amplia experiencia en éstas; b) el tipo de muestras y pacientes sobre los que se van a aplicar: las directrices propuestas actualmente por los CDC (Centers for Disease Control 'Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades') y la APHL (Association of Public Health Laboratories 'Asociación de Laboratorios de Salud Pública') de EE. UU. recomiendan realizar estas pruebas de AAN en, al menos, una muestra respiratoria (preferiblemente la primera) de un paciente con signos y síntomas de TB pulmonar pero sin diagnóstico definitivo, y cuando el resultado de la prueba pueda

influir en el tratamiento y las acciones necesarias para el control de la TB¹⁷. Es importante incidir en que estas técnicas no deberían utilizarse sistemáticamente cuando la sospecha clínica de TB pulmonar es baja, ya que el VPP es inferior al 50%^{7,18}. Por otro lado, aunque hay información sobre la utilidad de las técnicas de AAN en el diagnóstico rápido de TB extrapulmonar en casos puntuales, en la actualidad no hay pautas oficiales ni evidencia científica suficiente que proporcionen recomendaciones específicas para la realización de estas pruebas en muestras no respiratorias o muestras de pacientes en tratamiento antituberculoso¹⁷, y c) el desarrollo económico del país, así como la incidencia de TB y aislamientos de MNT en él: aparte del excelente VPP de estas técnicas en las áreas geográficas con una elevada incidencia de MNT, la aplicación de éstas está condicionada, en gran medida, por la disponibilidad de infraestructuras y recursos económicos suficientes. A pesar del sustancial coste intrínseco de las técnicas de AAN, la aplicación habitual en muestras respiratorias de pacientes con sospecha de TB permite de forma global un ahorro potencial significativo. Y esto es posible al reducir tratamientos, aislamientos y estudios de contactos innecesarios e intervenir más eficazmente en la interrupción de la cadena de transmisión^{7,17}. Al mismo tiempo, un diagnóstico rápido de TB puede evitar tratamientos empíricos inadecuados, como son las fluoroquinolonas ante la sospecha de neumonía, y el posible desarrollo de *M. tuberculosis* resistente a éstas, sin contar con el retraso del tratamiento específico de TB que esto conlleva¹⁹.

Por último, uno de los puntos más importantes y actuales es el diagnóstico rápido de la TB resistente a los antimicrobianos, y muy especialmente la TB multirresistente (isoniazida y rifampicina). Los métodos moleculares se fundamentan en la detección de las mutaciones en las dianas cromosómicas más frecuentemente relacionadas con la resistencia fenotípica a múltiples fármacos. En la actualidad hay diversos productos comerciales basados en una PCR e hibridación en tiras de nitrocelulosa, como el INNO-LiPA[®] y GenoType[®], que pueden detectar la multirresistencia a partir del cultivo y la muestra clínica en una jornada laboral, con excelente sensibilidad y especificidad^{4,9,20,21}. Aún más, el sistema GenoType[®] ha desarrollado una nueva tira que permite estudiar genotípicamente la resistencia a otros fármacos, como aminoglucósidos, fluoroquinolonas y etambutol, para lograr una detección precoz de cepas extremadamente resistentes. Aunque apenas hay experiencia con estos sistemas comerciales, sí existen múltiples estudios heterogéneos de diversos métodos caseros. Entre ellos, la PCR en tiempo real y los *chips* de ADN parecen ser rápidos, no especialmente complejos y de una sensibilidad aceptable en virtud del grado de conocimiento actual de los mecanismos de resistencia implicados^{4,9,21}. Aunque no hay directrices consensuadas, la OMS ha respaldado recientemente la utilización de los sistemas comerciales de PCR e hibridación en tiras de nitrocelulosa, en concordancia con los programas nacionales de salud, infraestructuras y recursos económicos de los diferentes países. La recomendación se ciñe a las muestras de esputo con baciloscopia positiva o aislamientos de cultivo en aquellos pacientes con un elevado riesgo de presentar una TB multirresistente²². En ningún caso estos métodos reemplazarían la realización de las pruebas de sensibilidad fenotípicas a los antituberculosos.

En resumen, sin bien las técnicas de biología molecular no pueden hoy por hoy sustituir completamente a la metodología tradicional en el diagnóstico de la TB, son un pilar fundamental en el diagnóstico rápido de ésta y de los casos graves de multirresistencia. La gran variedad de métodos disponibles y en constante evolución, así como los diferentes grados de aplicación,

ha conllevado la instauración progresiva e imprescindible de esta tecnología, en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica de los países desarrollados.

Bibliografía

- World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy and financing. WHO report 2009. WHO/HTM/TB/2009.411. WHO Press, 2009 [consultado 7/4/2009]. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html
- Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de León A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 1999;353:444–9.
- American Thoracic Society; Centers for Disease Control and Prevention; Council of the Infectious Disease Society of America. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1376–95.
- Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ, Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [9a]. SEIMC; 2005 [consultado 7/4/2009]. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>.
- Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9.ª ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 543–72.
- Vincent V, Gutiérrez MC. *Mycobacterium*: Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9ª ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2007. p. 573–88.
- Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess*. 2007;11:1–96.
- Alcaide F. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:53–7.
- Domínguez J, Blanco S, Lacota A, García-Sierra N, Prat C, Ausina V. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:33–41.
- Alcaide F, Benítez MA, Escriba JM, Martín R. Evaluation of the BACTEC MGIT960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol*. 2000;38:398–401.
- Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2672–5.
- Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina T, Valverde A, Saiz P, Jiménez MS. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009. doi:10.1016/j.eimc.2009.01.008
- Jiménez MS. Taxonomía polifásica aplicada a la identificación y tipificación de especies del género *Mycobacterium*. Caracterización y propuesta de nuevas especies [tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2006.
- Moore DF, Guzmán JA, Mikhail LT. Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis by routine use of a nucleic acid amplification test. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;52:247–54.
- Flores LL, Pai M, Colford Jr JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: Meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol*. 2005;5:55.
- Guerra RL, Hooper NM, Baker JF, Alborz R, Armstrong DT, Maltas G, et al. Use of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in a public health laboratory: Test performance and impact on clinical care. *Chest*. 2007;132:946–51.
- CDC. Update guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58:7–10.
- Catanzaro A, Perry S, Clarridge JE, Dunbar S, Goodnight-White S, LoBue PA, et al. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: Results of a multicenter prospective trial. *JAMA*. 2000;283: 639–45.
- Wang JY, Hsueh PR, Jan IS, Lee LN, Liaw YS, Yang PC, et al. Empirical treatment with a fluoroquinolone delays the treatment for tuberculosis and is associated with a poor prognosis in endemic areas. *Thorax*. 2006;61:903–8.
- Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA line assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:350–2.
- Alcaide F, Santín M. Tuberculosis multirresistente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:54–60.
- World Health Organization. Who policy statement. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). 2008. [consultado 7/4/2009] Disponible en: http://www.who.int/tb/dots/laboratory/line_probe_assays/en/index.html.