Análisis retrospectivo del rendimiento de Amplicor-PCR® para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa

Carolina Selman B., Helena Poggi M., Juan C. Román, Patricia García C. y Marcela Lagos L.

Assessment of the Amplicor PCR® for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in smear negative respiratory and non respiratory specimens: A retrospective analysis

Background: Commercial polymerase chain reaction (PCR) kits are widely accepted for analysis of smear positive respiratory specimens, but the sensitivity is variable for smear negative ones. **Objective:** To assess the PCR method usefulness in smear negative respiratory and non respiratory specimens. **Methods:** We compared the PCR results (AMPLICOR MTB test™, Roche) of 235 specimens subjected to culture in Loewenstein-Jensen agar (as the gold standard). **Results:** 181 (76%) were respiratory and 54 (24%) extra-respiratory specimens. The sensitivity was 88% and 50%, respectively, specificity and PPV was 100% in both cases. NPV was 99.4% in respiratory specimens and 96.1% in non-respiratory specimens. **Conclusions:** The good performance of this PCR in smear negative respiratory specimens allows the clinician to take decisions based on the result of this exam. In extra-respiratory specimens the contribution is important only when the PCR result is positive.

Key words: Polymerase chain reaction, molecular diagnostic testing, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis.

Palabras clave: Reacción de polimerasa en cadena, pruebas diagnósticas moleculares, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis.

Pontificia Universidad
Católica de Chile, Santiago
Facultad de Medicina
Departamento de Laboratorios
Clínicos
Laboratorio de Biología Molecular

Los autores declaran no tener
conflictos de interés

Recibido: 16 de abril de 2009

Aceptado: 5 de octubre de 2009

Correspondencia a:

Carolina Selman Bravo
c.selmanbravo@gmail.com

Introducción

La enfermedad tuberculosa, tanto respiratoria como extra respiratoria, es producida principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, especie perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*^{1,2}. Esta bacteria es un bacilo ácido-alcohol resistente, aerobio estricto y de crecimiento lento, que forma parte del “Complejo *Mycobacterium tuberculosis*”, el que incluye a *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida cepa BCG), *M. africanum*, *M. microti* y *M. canettii*.

Esta micobacteria puede ser detectada mediante la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en un frotis de muestra (baciloscopia) y mediante el cultivo de colonias características en medios específicos (como por ejemplo Loewenstein Jensen). La baciloscopia se utiliza ampliamente porque es una técnica de bajo costo y rápida, pero posee el inconveniente de tener una sensibilidad que varía entre 30 y 80%, dependiendo del tipo de muestra a analizar, los métodos de recuperación utilizados y de la población evaluada³⁻⁵. El cultivo es el método “estándar de oro”, pero dado el lento crecimiento de las micobacterias, el resultado puede demorar hasta 60 días en medios sólidos y hasta 30 días en medios líquidos^{6,7}. Estos métodos permiten la identificación a

nivel de género solamente, por lo que la cepa se debe enviar a laboratorios de referencia para la identificación de especie, haciendo muy lento el diagnóstico definitivo.

La detección temprana y el adecuado manejo de los pacientes con tuberculosis (TBC) pulmonar es el principal objetivo de los programas nacionales; sin embargo el aumento de la infección por VIH y del SIDA no sólo ha generado un alza en la incidencia de la TBC⁸⁻¹⁰, sino que ha generado un cambio en su presentación clínica y de laboratorio, incluyendo un aumento de las TBC con baciloscopias negativas¹¹. En estos casos, además de las estrategias tradicionales de detección por baciloscopia y cultivo, deben implementarse nuevos métodos diagnósticos que permitan un diagnóstico precoz, especialmente en las presentaciones respiratorias no bacilíferas y en las extra-respiratorias¹².

Desde hace algunos años se encuentran disponibles nuevas metodologías para el diagnóstico de enfermedades infecciosas basadas en la detección de ADN de los microorganismos, las que en su mayoría utilizan la reacción de polimerasa en cadena (RPC)¹². Durante esta reacción se produce la amplificación exponencial del material genético inicial, permitiendo el diagnóstico de infecciones causadas por microorganismos que no son cultivables *in vitro*, que requieren condiciones muy complejas para crecer o que presentan periodos de

incubación prolongados. Dada la lentitud del cultivo de micobacterias, la RPC realizada a partir de una muestra clínica directa, utilizando un buen método de extracción de ADN, representa una buena herramienta de apoyo al diagnóstico, ya que puede arrojar resultados en menos de 48 hrs. Sin embargo, existen numerosos reportes en la literatura médica indicando que la sensibilidad de estas técnicas en algunas muestras sería inferior incluso a la de la baciloscopia¹³⁻²⁰.

Actualmente, están disponibles distintos ensayos comerciales, basados en la amplificación por RPC para la detección del complejo *M. tuberculosis* que han demostrado ser más consistentes que los métodos case-ros¹³. Uno de ellos es el ensayo AMPLICOR MTB test® (Roche) que amplifica dirigidamente una región específica del complejo (la secuencia de inserción IS6110) y que posteriormente identifica con una sonda el fragmento amplificado utilizando un sistema de enzimo-inmunoanálisis (ELISA). Numerosas publicaciones evalúan esta prueba, la mayoría coincide en su buena especificidad (cerca a 100%)²¹ y en su sensibilidad en muestras respiratorias con baciloscopias positivas (mayor a 95%)²²⁻²⁴. Sin embargo, existen opiniones divididas acerca de su sensibilidad en muestras respiratorias con baciloscopias negativas²¹ y en muestras extra-respiratorias^{20,21,25}, lo que estaría dado por los diferentes métodos de descontaminación y lisis de micobacterias²⁶, tratamiento de inhibidores²⁷ y a una distribución heterogénea de las micobacterias en las muestras clínicas^{13,19}.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la sensibilidad y especificidad de esta RPC en nuestro centro en comparación con el método de referencia (cultivo), en muestras respiratorias y extra-respiratorias con baciloscopias negativas.

Materiales y Métodos

Pacientes y muestras: Se revisaron los resultados de 476 muestras que ingresaron al Servicio de Laboratorios Clínicos de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUCCh) entre los años 2004 y 2007, para ser analizadas mediante cultivo (en agar Loewenstein-Jensen) y para detección por RPC (AMPLICOR MTB test®, Roche) a partir de la misma muestra.

Se excluyó toda muestra con baciloscopia positiva, quedando finalmente 239 muestras para análisis. También se excluyó una muestra reconocida como *Mycobacterium avium* y tres muestras donde el resultado de la RPC fue “no concluyente” debido a la presencia de inhibidores en la muestra (una respiratoria y dos extra-respiratorias).

Las muestras fueron divididas en dos grupos: 181 (76%) muestras respiratorias (expectoración: 6, lavado broncoalveolar: 159, aspirado bronquial: 16) y 54 (24%) muestras extra-respiratorias (líquido ascítico: 1, biopsias: 18, líquido cefalorraquídeo: 12, orinas: 8, abscesos: 4, líquido articular: 2, líquido pericárdico: 2, líquido seminal: 1, líquido pleural: 5, otras muestras: 1).

Procesamiento de las muestras: Fueron procesadas de acuerdo a los protocolos utilizados rutinariamente en el Servicio de Laboratorios Clínicos del Hospital Clínico de la PUCCh. Previo a todo procesamiento, las muestras se descontaminaron utilizando el método de NaOH²⁸ y se cultivaron en agar Loewenstein-Jensen. Para la detección de ADN del complejo *M. tuberculosis* por RPC (AMPLICOR MTB test®, Roche), se extrajo el ADN de muestras respiratorias utilizando el método recomendado por el fabricante (MTB respiratory specimen preparation kit®, Roche) así como el ensayo comercial QIAgen DNeasy Blood & Tissue Kit® para las muestras de tejido^{13,29}.

Análisis estadístico: La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictor positivo (VPP) y valor predictor negativo (VPN) fueron calculados mediante el programa Minitab³⁰, considerando el cultivo como “estándar de oro”.

Resultados

De las 181 muestras respiratorias, siete se encontraron positivas, tanto por cultivo como por RPC, y dos se encontraron positivas sólo por cultivo. No se encontraron

Tabla 1. Resultados en muestras respiratorias

RPC	Cultivo		Total	
	Positivo	Negativo		
Positiva	7	0	7	VPP: 100%
Negativa	1	173	174	VPN: 99,4%
Total	8	173	181	
S: 88% E: 100%				

Tabla 2. Resultados en muestras extra-respiratorias

RPC	Cultivo		Total	
	Positivo	Negativo		
Positiva	2	0	2	VPP: 100%
Negativa	2	50	52	VPN: 96,1%
Total	4	50	54	
S: 50% E: 100%

muestras positivas sólo por RPC. Un total de 173 muestras fueron negativas por ambos métodos. La sensibilidad de la técnica para muestras respiratorias fue de 88%, la especificidad de 100%; el VPP de 100% y VPN de 99,4% (Tabla 1).

Dentro de las 54 muestras extra-respiratorias, dos se encontraron positivas tanto por cultivo como por RPC, dos se encontraron positivas sólo por cultivo; y ninguna se encontró positiva sólo por RPC. La sensibilidad del método en muestras extra-respiratorias fue de 50%, la especificidad de 100%; el VPP de 100% y el VPN de 96,1% (Tabla 2).

Discusión

La RPC para la detección de ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se utiliza ampliamente en muestras respiratorias, pero también en muestras extra-respiratorias, por la rapidez con que se obtienen resultados y por la alta especificidad y sensibilidad, sobre todo en muestras con baciloscopia positiva. En pacientes con baciloscopia negativa, en los que se espera el mayor beneficio de una RPC para detectar *M. tuberculosis*, sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de estos métodos son altamente variables. Existen numerosos estudios sobre métodos comerciales³², y también no comerciales^{33,34}, al respecto, donde se concuerda en que hay buen nivel de especificidad pero no de sensibilidad. Esto se debe a distintos factores, como por ejemplo el uso de métodos caseros *versus* métodos comerciales, métodos que utilizan sondas o que no las usan, distintos tipo de muestra y de pre-tratamiento de la muestra, métodos con extracción de ADN optimizados, etc.

En este trabajo se observó una buena sensibilidad en muestras respiratorias con baciloscopia negativa, cercana a 90%, lo que se acerca a los valores más altos reportados en la literatura científica³³. En nuestro laboratorio, además de la extracción y purificación básicas de las muestras, se han incorporado purificaciones especiales recomendadas^{13,29} lo que probablemente ha contribuido a un mejor rendimiento en la recuperación de ADN de la muestra. En muestras extra-respiratorias, el rendimiento es inferior, lo que sin embargo concuerda también con la literatura científica, ya que se puede tratar de tejidos con presencia de inhibidores (dos de las tres muestras inhibidas de nuestra serie), en los que es posible que se encuentre baja cantidad de micobacterias, no distribuidas uniformemente.

Sin duda, el método de RPC en uso en nuestro labora-

torio es un aporte para el médico clínico, especialmente en muestras respiratorias con baciloscopia negativa, por la alta sensibilidad, junto con valores altos de especificidad, VPP y VPN, lo que le permite al médico tratante contar con un diagnóstico precoz cuando la baciloscopia es negativa pero la clínica es sugerente. Todo esto tomando en cuenta, que debido al aumento de la infección por VIH, los cuadros son cada vez más atípicos, con menor carga bacteriana³².

La sensibilidad obtenida en muestras extra-respiratorias con baciloscopia negativa demuestra que, aunque la RPC es un aporte complementario al cultivo, la sensibilidad en estas muestras es insuficiente, por lo que debe destacarse que un resultado negativo no descarta la infección por *M. tuberculosis*.

La razón fundamental de evaluar esta RPC para detectar ADN de *M. tuberculosis* es enfatizar la importancia de conocer el rendimiento de los métodos que se utilizan localmente. Esto permite un uso racional en clínica, conociendo sus ventajas y desventajas aplicadas a la realidad local.

Agradecimientos. Especialmente a nuestro administrador del sistema de informática, Carlos Salcedo, por su paciencia y buena voluntad para buscar los datos.

Resumen

Introducción: Los métodos comerciales de reacción de polimerasa en cadena (RPC) están validados para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* sólo en muestras respiratorias con baciloscopia positiva. En muestras con baciloscopia negativa, la sensibilidad es variable. **Objetivo:** Evaluar el comportamiento de la RPC en uso en muestras con baciloscopia negativa. **Método:** Se compararon los resultados de 235 muestras analizadas por cultivo en agar Loewenstein-Jensen ("estándar de oro") y RPC (AMPLICOR MTB test[®], Roche). **Resultados:** Se analizaron 181 muestras respiratorias y 54 muestras extra-respiratorias. La sensibilidad de la RPC fue de 88 y 50%, respectivamente, la especificidad y el VPP fueron, en ambos casos, de 100%, y el VPN fue de 99,4% en muestras respiratorias y de 96,1% en extra-respiratorias. **Conclusiones:** El buen desempeño de esta RPC en muestras respiratorias con baciloscopia negativa permite al médico clínico tomar decisiones en base al resultado de este examen, fundamentadamente. En muestras extra-respiratorias, sólo pueden sacarse conclusiones frente a resultados de RPC positivos.

Referencias

- 1.- Pfyffer G, Brown-Elliot B A, Wallace R J. *Mycobacterium*: General characteristics, isolation, and staining procedures. Murray P.R. Manual of Clinical Microbiology, 8th 2003 ed. American Society for Microbiology, Washington, DC pp: 532-59.
- 2.- Shinnick T M, Good R C. Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13 (11): 884-901.
- 3.- Morán Moguel M C, Hernández D A, Pena Montes de Oca P M, Gallegos Arreola M P, Flores Martínez S E, Montoya Fuentes H, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* with polymerase chain reaction in a selected population in northwestern Mexico. Rev Panam Salud Pública 2000; 6: 389-94.
- 4.- Perkins M. New diagnostic tools for tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4 (12 Suppl 2): S182-S188.
- 5.- Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. An Sist Navar 2007; 30: Suppl 2: 67-85. Review.
- 6.- Kent P T, Kubica G P. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.
- 7.- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. JAMA 1999; 282: 677-86.
- 8.- Lado Lado F L, Barrio Gómez E, Carballo Arceo E, Cabarcos Ortiz de Barrón A. Tuberculosis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana: Manifestaciones clínicas y rendimientos de procedimientos diagnósticos según las distintas formas de localización de la enfermedad. An Med Interna (Madrid) 2000 Jan; 17(1): 27-34. PMID: 10730399.
- 9.- Viera M, Bischofberger C, Pérez de Oteyza C. Estudio epidemiológico y clínico de los pacientes diagnosticados de tuberculosis en el área noroeste de Madrid. An Med Interna (Madrid) 2003; 20 (1): 10-5.
- 10.- Martínez Vázquez J M, Cabarcos A, Barrio E. Tuberculosis e infección por VIH: epidemiología (1ª parte). An Med Intern (Madrid) 1997; 14: 253-6.
- 11.- Mello F C, Bastos L G, Soares S L, Rezende V M, Conde M B, Chaisson R E, et al. Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study. BMC Public Health 2006; 6: 43-51.
- 12.- Marcone P. Aplicaciones de la biología molecular en el programa nacional de tuberculosis en Chile: ¿lujo o necesidad? Rev Chil Enf Respir 2006; 22: 201-8.
- 13.- Honoré-Bouakline S, Vincensini J P, Giacuzzo V, Lagrange P H, Herrmann J L. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and ADN extraction. J Clin Microbiol 2003 (41); 6: 2323-9.
- 14.- Ehlers S, Ignatius R, Regnath R, Hahn H. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. J Clin Microbiol 1996; 34: 2275-9.
- 15.- O'Sullivan C E, Miller D R, Schneider P S, Roberts G D. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and non respiratory specimens in a tertiary care center laboratory. J Clin Microbiol 2002; 40 (5): 1723-7.
- 16.- Shah S, Miller A, Mastellone A, Kim K, Colaninno P, Hochstein L, D'Amato R. Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by the amplicor *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction test. Chest 1998; 113 (5): 1190-4.
- 17.- Viveiros M, Pinheiro S, Moreira P, Pacheco T, Brum L. Evaluation of a comercial ligase chain reaction assay for the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3 (6): 508-4.
- 18.- Della-Latta P. The mycobacteriology milestones: journeying to the new millennium. Lab Med 1999; 30: 408-17.
- 19.- Ieven M, and Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 242-56.
- 20.- Woods G L. Molecular techniques in mycobacterial detection. Arch Pathol Lab Med 2001; 125: 122-6.
- 21.- Sarmiento O, Weigle K A, Alexander J, Weber D, Miller W C. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2003 (41); 7: 3233-40.
- 22.- Lim T K, Mukhopadhyay A, Gough A, Khoo K L, Khoo S M, Lee K H, et al. Role of clinical judgment in the application of a nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 2003; 124 (3): 902-8.
- 23.- Saboor S A, Johnson N M, McFadden J. Detection of mycobacterial ADN in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. Lancet 1992; 339(8800): 1012-5.
- 24.- American Thoracic Society Workshop. Rapid diagnostic test for tuberculosis: what is the appropriate use? Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 1804-14.
- 25.- Noordhoek G T, van Embden J D, Kolk A H. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol 1996; 34: 2522-5.
- 26.- Forbes B A. Critical assessment of gene amplification approaches on the diagnosis of tuberculosis. Immunol. Investig 1997; 26: 105-16.
- 27.- Zúñiga M, Marcone P, Riquelme C. Reflexiones sobre la tuberculosis en Chile, 2006. Rev Chil Enf Respir 2007; 23: 59-66.
- 28.- Scott C P, Dos Anjos Filho L, De Queiroz Mello F C, Thornton C G, Bishai W R, Fonseca L S, et al. Comparison of C(18)-carboxypropylbetaine and standard N-acetyl-L-cysteine-NaOH processing of respiratory specimens for increasing tuberculosis smear sensitivity in Brazil. J Clin Microbiol 2002; 40 (9): 3219-22.
- 29.- Dinghaus B, Wichelhaus T, Brade V, Bittner T. Removal of PCR inhibitors by silica membranes: Evaluating the Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit. J Clin Microbiol 2001; 39 (10): 3750-2.
- 30.- Minitab 15. Software para mejora de la calidad. <http://www.minitab.com/es-CL/default.aspx> descarga en marzo del año 2008.
- 31.- Kibiki G S, Mulder B, van der Ven A J, Sam N Boeree M J, van der Zanden A, Dolmans W M, et al. Laboratory diagnostics of pulmonary tuberculosis in TB an HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. Trop Med Int Health 2007; 12 (10): 1210-7.
- 32.- Ling D I, Flores L L, Riley L W, 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.
- 33.- Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. J Clin Microbiol 2009; 47 (3): 569-76. Epub 2009 Jan 14.
- 34.- Flores L L, Pai M, Colford J M Jr, Riley L W. 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.