

# Métodos Diagnósticos en Tuberculosis: lo convencional y lo nuevo

Ramón Fúnez Solórzano\*, Cecilia Varela-Martínez†

## GENERALIDADES

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades con mayor mortalidad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año se diagnostican más de 8 millones de casos nuevos de Tuberculosis, y aproximadamente 3 millones de personas mueren de esta enfermedad.<sup>1</sup> El 95% de los casos a nivel mundial ocurren en países en vías de desarrollo como el nuestro, donde hay mucha pobreza y escasos recursos para estudios diagnósticos y tratamiento, y hay una elevada prevalencia de infección por el virus del VIH.

En Honduras la tasa de incidencia de tuberculosis fue de 50.8 por cien mil habitantes en el 2003, diagnosticándose un promedio de 4500 casos por año, de los cuales el 85% son tuberculosis de formas pulmonares, 62% de ellos diagnosticados por medio de baciloscopía.<sup>2,3</sup>

La Tuberculosis es considerada una enfermedad social con implicaciones médicas. Esta enfermedad siempre ha ocurrido en forma desproporcionada entre poblaciones en desventaja como son las personas sin hogar, desnutridos, o en hacinamiento. En las últimas décadas se ha vuelto claro que la diseminación de la infección del VIH y la migración de las poblaciones ha incrementado el número de casos a nivel mundial.

\* Médico Residente del III Año de Postgrado de Medicina Interna, UNAH.

† Neumóloga Internista. Postgrado de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (U.N.A.H.).

Dirigir correspondencia a: Dra. Cecilia Varela-Martínez Correo electrónico: lutvar@yahoo.com.mx

## EL DIAGNÓSTICO

### Aspectos clínicos

Desde el punto de vista clínico el diagnóstico de tuberculosis se viene haciendo desde tiempos de Hipócrates. El cuadro clínico ha sido bien definido desde entonces donde se identifican síntomas generales como fiebre, pérdida de peso sudoración nocturna, y los síntomas de afectación local de acuerdo al órgano principalmente afectado. Siendo que en la mayor parte de los casos de tuberculosis que afecta a personas inmunocompetentes, el pulmón es el órgano mas afectado, los síntomas son principalmente tos crónica y hemoptisis.<sup>4,5</sup> En Honduras, los primeros diagnósticos se establecieron desde tiempos de la conquista y de la colonia, precisamente en base a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, de tal manera que existen datos bibliográficos de ilustres ciudadanos afectados por la enfermedad en ese tiempo.<sup>6,7</sup>

Antes del inicio de la epidemia del VIH, aproximadamente el 85% de los casos reportados estaban limitados a los pulmones, con el 15% restantes afectando sitios extrapulmonares o ambas. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de la tuberculosis pueden ser muy variables y dependen de muchos factores. El diagnóstico puede pasarse por alto en ciertos pacientes, en particular en los pacientes inmunosupresos quienes pueden tener hallazgos atípicos tanto en su presentación clínica como en la radiografía de tórax donde pueden encontrarse infiltrados basales sin la presencia de cavidades.

### El diagnóstico Microbiológico

El descubrimiento del agente causal por el Dr. Robert

Koch en Alemania en 1882, permitió avanzar en el diagnóstico microbiológico. La Prueba de Ziehl Neelsen o tinción ácido alcohol resistente fue descrita por dos doctores alemanes: Franz Ziehl (1859-1929) microbiólogo y Friedrich Neelsen (1854-1894), patólogo. La tinción utiliza carbolfucsina, ácido alcohol y azul de metileno. Las micobacterias se tiñen de rojo, lo cual permite establecer la presunción diagnóstica.<sup>10</sup> Tanto la baciloscopia como el cultivo del *Micobacterium tuberculosis* en medio Löwenstein Jensen han sido y son el arma básica de diagnóstico. En países de alta prevalencia la enfermedad es confirmada con la clínica y la baciloscopia, siendo estrategia fundamental, encontrar al sintomático respiratorio (paciente con más de 15 días de tos con expectoración)<sup>8-11</sup> a través de la búsqueda pasiva, a fin de lograr las metas de diagnosticar por este medio, al menos el 70% de los pacientes con la enfermedad y curar más del 85% de los pacientes diagnosticados, con la combinación de fármacos antifímicos bajo estrategia TAES.<sup>9-11</sup> Con esta estrategia se prevé una progresiva disminución de la incidencia de este mal. El cultivo y la identificación se dejan para casos de incertidumbre diagnóstica o mala evolución al tratamiento.

La ventaja del método de la baciloscopia es que puede ser efectuada en casi cualquier lugar y que el hallazgo de bacilos ácido alcohol resistente en áreas de alta prevalencia es prácticamente confirmatorio de la presencia de la enfermedad<sup>11</sup>. Múltiples estudios han demostrado el incremento de la sensibilidad, manteniendo la especificidad, si se efectúan baciloscopias seriadas, o se concentra la muestra de esputo, así como con el uso de microscopio fluorescente.<sup>12</sup> La falla en establecer correctamente el diagnóstico de tuberculosis expone al paciente a un régimen medicamentoso equivocado y retrasar el tratamiento apropiado.<sup>12</sup>

### Limitaciones de la baciloscopia

Sin embargo es bien conocido el hecho de que existen limitaciones de sensibilidad y especificidad de la prueba de Ziehl Neelsen, de tal manera que para mejorar su valor predictivo positivo deben efectuarse al menos tres baciloscopias seriadas, ( la segunda baciloscopia capta de un 7 a un 13% más de pacientes, la tercera, alrededor de 4% más de pacientes con tuberculosis) lográndose con esto hasta un 85% de detección del paciente tuberculoso bacilífero en localidades de moderada o alta prevalencia.<sup>12</sup>

Uno de los problemas para el manejo individual es que la enfermedad debe haber avanzado sustancialmente, para que permita que la persona tengan concentraciones suficientes para que la tinción sea positiva (arriba de  $10^3$  bacilos por  $\text{cm}^3$  de esputo). En este sentido el cultivo es más sensible por cuanto requiere concentraciones mucho menores (10-100 bacilos por  $\text{cm}^3$  de esputo) con la limitante que el cultivo por medios sólidos requiere de varias (6-8 semanas) semanas para brindar el resultado.<sup>11-14</sup>

Sin embargo existen pacientes con tuberculosis activa cuyas baciloscopias seriadas son negativas. La radiografía de tórax, altamente sensible, es sin embargo inespecífica y el diagnóstico de tuberculosis no debe ser establecido solo por este método.<sup>11</sup>

Los estudios revelan los dos extremos cuando se hace diagnóstico en base a los hallazgos radiológicos, por un lado exceso de diagnóstico de la enfermedad<sup>9</sup> (falsos positivos) y también exceso de falsos negativos. En un estudio de la India de 2229 pacientes examinados fluoroscópicamente, 227 fueron clasificados como con tuberculosis, de ellos 81 pacientes tuvo cultivo negativo (36%) y se encontraron 31 (1.5%) con estudio considerado normal pero con cultivos positivos.<sup>13</sup>

Por otro lado la tuberculosis puede afectar cualquier otro órgano del cuerpo. En Honduras del 10 al 15% de las tuberculosis son extrapulmonares.<sup>9</sup> El diagnóstico de la enfermedad se basa, en estos casos, en la obtención de líquidos o tejido para baciloscopia, cultivo y estudio histológico. La baciloscopia en tuberculosis extrapulmonar, suele ser muy insensible por cuanto generalmente son muestras paucibacilares. El cultivo tiene mayores probabilidades de confirmar el diagnóstico, con la desventaja de los costos, complejidad técnica y la posibilidad de un retraso en el tratamiento debido a la tardanza en obtener resultados. En estos casos pueden ser de utilidad los nuevos métodos de diagnóstico.

### NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

En los últimos 15 años se han realizado investigaciones tratando de mejorar la sensibilidad, especificidad, rapidez y costos de los medios diagnósticos de la tuberculosis.

Una clasificación de esos nuevos métodos están en el Cuadro No. 1.

**Cuadro No. 1.** Métodos no Convencionales y nuevas técnicas de diagnóstico de la tuberculosis.<sup>13</sup>

- 1.- Técnicas no convencionales de baciloscopia
- 2.- Nuevos métodos de cultivo de micobacterias
- 3.- Nuevas técnicas de identificación del bacilo  
Técnicas de biología Molecular  
Técnicas de amplificación Genética
4. Nuevos métodos de antibiograma
- 5.- Diagnóstico serológico de la tuberculosis
- 6.- Otras técnicas no microbiológicas

### 1.- Técnicas no convencionales de baciloscopia

1.1 Auramina. En relación al diagnóstico a través del examen del esputo, además de la prueba de Ziehl Neelsen se encuentra la tinción con fluorocromos, la cual mantiene los principios de ácido-alcohol resistencia. La ventaja es que al poderse ver los bacilos con tinción fluorescente es posible observar la presencia de micobacterias de manera más rápida y a menor aumento con el microscopio, lo cual permite que en menos tiempo puedan observarse más campos. Este método es especialmente útil en laboratorios con alta demanda. La desventaja es que el método requiere de equipo mas costoso y de corriente eléctrica permanente. La sensibilidad es igual a la baciloscopia.

### 2.-Nuevos medios de cultivo

Los nombres de algunas técnicas no convencionales de cultivos del M tuberculosis pueden verse en el Cuadro No. 2.

**Cuadro No. 2.** Métodos no convencionales de cultivo del *M tuberculosis*

Nombre	Técnica
<b>Producción de gas</b>	
MYCO/BACT	(detección colorimétrica de CO <sub>2</sub> )
BACTEC 460	(detección de <sup>14</sup> C)
DIFCO "ESP"	(incremento de presión)
<b>Consumo de oxígeno</b>	
MIGIT	( uorométricos no automatizado)
BACTEC 9000	uorométrico automatizado
SEPTICHECK	liquido/solido

2.1 Medios de cultivo liquido. Son más rápidos y sensibles que el cultivo en medios semisólidos (Lowestein Jensen) pero con la desventajas de presentar dificultades para

reconocer crecimientos mixtos de bacterias, morfología y conteo de colonias (de mucha utilidad en casos de retratamiento) y mayores problemas de contaminación. Los exámenes que detectan tempranamente crecimiento no son específicos de *M tuberculosis*. Los medios de cultivo liquido pueden ser radiométricos y no radiométricos.

Radiométricos: Bactec 460, es uno de los avances mas importantes en cuanto a diagnóstico microbiológico. Detecta automáticamente el crecimiento bacteriano a través del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> producido por la bacteria que metaboliza el sustrato marcado con <sup>14</sup>C. Este método posibilita un diagnóstico mas temprano pues puede detectar crecimiento del bacilo en una semana en pacientes con baciloscopia positiva y en dos semanas en aquellos con baciloscopia negativa<sup>14</sup> (dos semanas e identificar el M tuberculosis en 4-5 días). Además es un método mas sensible que el cultivo convencional (70-95% vs 60-80% respectivamente),<sup>14</sup> no se requieren subcultivos para efectos de identificación ni sensibilidad antimicrobiana. Entre las desventajas se encuentran, que es un método laborioso, emplea radioisótopos, el costo del equipo, reactivos y mantenimiento, es alto, y existe potencial formación de aerosoles. Se justifica su uso solo en laboratorios regionales de referencia.<sup>13</sup>

No radiométricos: Existen también métodos de cultivo líquidos que no emplean radioisótopos [Mycobacteria Growth Indicator Tube System (MGITS), MBBAC, ESPII) con iguales ventajas al anterior y además que son automatizados, incorporan al medio de cultivo un compuesto que emite fluorescencia al descender la tensión de oxígeno, mismo que ha sido consumido a consecuencia del crecimiento bacilar. Su costo imposibilita su uso en los países de mayor prevalencia de la enfermedad.

2.2 Medios de cultivo bifásico no radiométrico (MB-SeptiCheck). Los frascos contienen 20 ml de caldo 7H9 de Middlebrook, además del medio sólido. Este método de cultivo presenta igual sensibilidad, aunque menos rapidez, que BACTEC, sin utilizar radioisótopos. Tiene también la desventaja de los costos. No permite estudios de sensibilidad y frecuentemente falla la identificación del bacilo.

2.3 Hemocultivos. Se han desarrollado debido a la frecuencia de bacteremia de *M avium intracelular* y de *M. tuberculosis* en pacientes con HIV/SIDA severamente inmunodeprimidos. Utilizan la técnica de lisis-centri-

fugación.

### 3.-Nuevas técnicas de Identificación<sup>13</sup>

Los estudios rutinarios de identificación son efectuados por técnicas bioquímicas que implican lentitud, complejidad y falta de reproducibilidad, por lo que se han desarrollado nuevas técnicas de identificación que incluyen el Test de NAP en Bactec 12B, la cromatografía y la identificación por métodos moleculares.

3.1 Test de NAP en Bactec 12B. Un precursor del cloranfenicol (p-nitro-alfa-acetilamino-beta-hidroxipropiofenona) inhibe el crecimiento del complejo *M tuberculosis*, de tal manera que al inocular la muestra a identificar se efectúa en dos frascos Bactec 12B, uno de los cuales contiene NAP. Si en dicho frasco no crece la micobacteria, significa que pertenece al Complejo *M tuberculosis*.

3.2 Identificación por Cromatografía.

Las micobacterias tienen una pared celular muy rica en lípidos. La composición de la pared lipídica de cada especie es específica, las cuales pueden separarse en ésteres. Los ácidos micólicos son los componentes más estudiados de la pared celular de las micobacterias. Se pueden separar grupos de micobacterias por cromatografía de capa fina e identificarse por cromatografía de gases. El estudio es altamente específico pero su costo es muy elevado para ser implementado en países de bajos recursos

3.3 Técnicas de Biología Molecular

3.3.1 Técnicas de hibridación

La Biología molecular ha permitido la detección de la secuencia de ADN o ARN de diferentes micobacterias. Se han preparado sondas con secuencias de ácidos nucleicos complementarios a las secuencias de ADN o ARN de diferentes especies (entre ellas la de *M tuberculosis*, *M avium*, *M Kansasii*, *M gordonae*.) las cuales están marcadas con isótopos radiactivos (sondas calientes) o sustancias cromógenas (sondas frías). La sonda genética es capaz de fijarse o hibridarse con su fragmento homólogo de la muestra en estudio, la cual ha sido previamente desnaturalizada por medios físicos. La hibridación de la sonda a su fragmento homólogo se detecta fácilmente gracias al marcador incorporado. Las principales ventajas de estas técnicas son la rapidez y la especificidad. Sus desventajas son el costo y que no puede identificar especies dentro del complejo *M tuberculosis*<sup>13</sup>

3.3.2 Técnicas de amplificación

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es

una técnica “in vitro” que imita la habilidad natural de duplicar el ADN. En el campo del diagnóstico clínico, los laboratoristas pueden tomar una muestra mínima de material genético, copiar la secuencia de interés las veces necesarias y generar suficiente cantidad de muestra para detectar la presencia o ausencia de patógenos y en muchos casos realizar la cuantificación del mismo. Esta es una tecnología patentada que genera múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos de un organismo. La tecnología de PCR, ideada por Kary Mullis y desarrollada por un equipo de científicos de la Corporación Cetus, fue publicada por primera vez el año 1985 en la revista científica *Science* y es reconocida como una de las herramientas más poderosas de la Biología Molecular. El Dr. Mullis, se hizo acreedor del Premio Nóbel en Química 1993 por este aporte.<sup>13-20</sup>

Hay disponibles múltiples sistemas basados en la amplificación de los ácidos nucleicos de las micobacterias. Existen múltiples objetivos para amplificar incluyendo fragmentos de DNA o RNA. El más frecuentemente estudiado y amplificado en Tuberculosis es IS6110 (Ref.15). De acuerdo a la FDA, la sensibilidad de los test para tuberculosis, comparada con la de los cultivos es de aproximadamente 95% en pacientes con baciloscopías positivas pero solo de alrededor de 50% en pacientes con baciloscopías negativas.<sup>16</sup>

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), al multiplicar en millones de veces un fragmento determinado ADN permite la identificación de diferentes maneras:<sup>13</sup>

- Amplificar con cebadores apropiados y detectar después un fragmento específico de una determinada especie por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.<sup>13</sup>
- Amplificar un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias y después identificarla por medio de sondas genéticas específicas.
- Amplificar un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias, someterlas a lisis con enzimas de restricción y visualizar los fragmentos de restricción en gel de agarosa. Esta metodología denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa y análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) es de gran utilidad en la identificación rápida de las especies de *Mycobacterium*.

Estos sistemas permiten un diagnóstico de tuberculosis en tan solo unas pocas horas. Las pruebas de biología molecular actualmente en uso en el laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis son AMTDT (Gee-Probe), basado en la amplificación enzimática del RNA ribosómico, AMPLICOLOR (*Mycobacterium tuberculosis* PCR test, Roche Diagnostic Systems) basado en la amplificación del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa y el LCx (LCR *Mycobacterium tuberculosis* assay, Abbott Laboratories), sistema de amplificación que utiliza la reacción de la ligasa.<sup>18-19</sup> Sin embargo su aplicabilidad está limitada por una baja sensibilidad (menor que el cultivo, pero mayor que la baciloscopia) y alto costo. Datos de la literatura, confirman excelentes resultados en especímenes respiratorios con tinción positiva, en lo que se basa las recomendaciones de FDA. Estas técnicas tienen una especificidad de más del 95% y una sensibilidad mayor del 95% en pacientes con baciloscopia positiva<sup>17-21</sup> sin embargo se señalan las limitaciones de estos métodos en muestras extrapulmonares y muestras con baciloscopia negativas; sin embargo se reconoce que estas pruebas de amplificación genética (AG) pueden tener utilidad para el diagnóstico de Tuberculosis pulmonar con baciloscopías negativas o Tuberculosis extrapulmonar en grupos selectos de pacientes.<sup>17</sup>

El diagnóstico de estas formas de la tuberculosis, aunque poco importante desde el punto de vista epidemiológico, constituye un reto para el clínico, debido a lo atípico de sus manifestaciones, en ocasiones a la escasa expresividad clínica y, en la mayoría de los casos, a las dificultades que plantea la confirmación microbiológica mediante los métodos clásicos. Existen muchos estudios publicados comparando los métodos de Ampliación nucleica (PAN) con el examen microscópico y el cultivo de material obtenido de enfermedad extrapulmonar, la mayoría con muestras seleccionadas y, por lo tanto, no totalmente extrapolables sus resultados a la práctica diaria.<sup>21-22</sup>

A modo de resumen, las ventajas que aportan los métodos de Ampliación Genética respecto a los métodos clásicos en el diagnóstico de tuberculosis son la sensibilidad respecto al examen microscópico y la rapidez respecto al cultivo en tuberculosis pulmonar. En la tuberculosis extrapulmonar los métodos de PAN son más sensibles que el examen microscópico y que el cultivo. Además, la Ampliación Genética permite la confirmación rápida de que el BAAR (bacilos alcohol-ácido resistentes) detectado en el examen

microscópico es *M. tuberculosis*. Entre las limitaciones de estos métodos hay que destacar que puede no ser un método tan rápido como se propugna cuando se utiliza en laboratorios de microbiología que procesan pocas muestras, al final el análisis costo-eficiencia, teniendo en cuenta que, en la situación actual, es un método que complementa pero no desplaza a los anteriores, significa por lo tanto, un aumento de recursos humanos y materiales.

Las indicaciones recomendadas por la Sociedad Torácica Americana para estos métodos incluye principalmente la confirmación de que una baciloscopia positiva es realmente *Mycobacterium tuberculosis*. Además con la disponibilidad de nuevas versiones de esta prueba con mayor sensibilidad, se puede utilizar para el diagnóstico rápido de pacientes con baciloscopia negativa.<sup>9</sup> El Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos recomienda la realización de PCR al mismo tiempo que el BAAR para detectar enfermedad por micobacterias no tuberculosas (BAAR positivo, PCR negativo).<sup>23-24</sup>

También puede contribuir para diagnóstico rápido de casos difíciles (meningitis tuberculosa, tuberculosis diseminada en pacientes con SIDA), evitar técnicas cruentas (biopsia pleural, extirpación de adenopatías, biopsia hepática, biopsia ósea), evitar tratamientos empíricos ante cuadros donde los métodos tradicionales han sido poco rentables (tuberculosis renal, tuberculosis intestinal).

### 3.3.3 Uso apropiado de las pruebas

En la actualidad existen áreas de incertidumbre a cerca de la aplicabilidad e interpretación de estas pruebas rápidas y los resultados deben analizarse con precaución: los resultados de pruebas de amplificación nucleica (PAN) pueden mantenerse positivos por meses a pesar de una terapia adecuada y buena respuesta clínica, así que el test puede ayudar en el diagnóstico pero no en el seguimiento, respecto a respuesta al tratamiento o capacidad infecciosa de la persona.<sup>25</sup> Resultados discordantes en que una baciloscopia es positiva y un test de ácidos nucleicos es negativo, puede ser secundario a una enfermedad por una micobacteria no tuberculosa, una PAN falsa negativa, o un BAAR falso positivo. Si las micobacterias no tuberculosas son comunes en la comunidad, se recomienda que la terapia sea retrasada hasta obtener confirmación por cultivos. En contraste, según Cantanzaro<sup>25</sup> no se debe retrasar la terapia antituberculosa si la existencia de Micobacterias no tuberculosas en la comunidad son raras, lastimosamente

mente pocas veces se cuenta con esta información en los países de mayor prevalencia. Una situación clínica donde las PAN podrían ser de apoyo en las decisiones clínicas es que el paciente tuviera baciloscopía positiva pero tuviera bajo riesgo, en bases clínico-epidemiológicas, de estar enfermo por tuberculosis. En esta situación un resultado negativo de PAN implica que hay que buscar una alternativa diagnóstica. Sin embargo hay que tener en cuenta que hay en las PAN un 4-5% de falsos negativos en pacientes BAAR positivos, por lo cual se recomienda retrasar el tratamiento hasta obtener el cultivo. En caso de situación clínico-epidemiológica de alto riesgo el tratamiento no se debe retrasar.<sup>25</sup>

En la situación que el BAAR es negativo, una PAN positiva puede ser de valor en detección temprana de aproximadamente 50% de casos activos de Tuberculosis que son BAAR negativos. A pesar de que la FDA no recomienda las pruebas de ampliación genética en pacientes BAAR negativos; en el caso de sospecha de tuberculosis, BAAR negativos pero NAA positiva Cantanzaro<sup>25</sup> recomienda el inicio de tratamiento e investigación de contactos y cita el estudio en que se reporta una sensibilidad de 53 % y especificidad de 93% vs cultivo usando Amplicor en paciente con sospecha de TB y baciloscopías negativa.<sup>26</sup> Los BAAR falsos negativos son más frecuentes en laboratorios donde no se realizan de rutina.

### 3.3.4 Muestras no respiratorias

Varios reportes describen la utilidad de PAN en estudios de especímenes extrapulmonares. En un estudio en que se realizó BAAR, Cultivo y ensayo de Amplicor la sensibilidad fue de 73%, especificidad de 99%, sin embargo faltan aún estudios que exploren este contexto para que sea recomendado de forma rutinaria. La FDA no ha aprobado el uso de PAN en muestras extrapulmonares pero varios estudios reportan su utilidad especialmente en líquido gástrico, ganglios y piel. Sin embargo en el líquido pleural parece ser que la detección de *M tuberculosis* tiene problemas debido a cantidad de inhibidores en el material pleural que reducen la sensibilidad de la misma. En relación a las meninges esta es la mejor prueba con la que se cuenta para confirmar diagnóstico de meningitis tuberculosa.<sup>27,28</sup>

### 3.3.5 Recomendaciones

Las PAN no deben ser efectuados en ausencia de baciloscopía y cultivos, y la interpretación de los resultados

depende del contexto clínico. Un test de ampliación genética positivo con baciloscopía positiva es diagnóstico de tuberculosis.

En pacientes con sospecha clínica de tuberculosis pero baciloscopía negativa una PAN positiva debe interpretarse como diagnóstica de tuberculosis, una PAN negativa aunque no descarta Tuberculosis obliga a efectuar exámenes más invasivos como broncoscopias o biopsias.

## 4.- Diagnóstico de drogossensibilidad

A partir de la década del 90 del siglo XX, con el avance de la epidemia del HIV/SIDA y la Multidrogoresistencia, surgen numerosos métodos para investigar drogossensibilidad. Sin embargo, de todos ellos solamente son reconocidos cuatro; tres son llevados a cabo en medio de cultivo sólidos, que son el cociente de la resistencia, concentraciones absolutas y método de las proporciones, cuyo resultado tarda de 21 a 28 días después de tiempo equivalente para obtener e identificar el bacilo. El cuarto método es llevado a cabo sobre medio líquido Bactec 460 con lectura semiautomatizada que tarda de 3 a 5 días. El método de las proporciones, a pesar del inconveniente de su lentitud en dar resultados, es el método de referencia más utilizados.

Los estudios de sensibilidad de *M tuberculosis* pueden llevarse a cabo por técnicas fenotípicas y técnicas genéticas

4.1 En medio sólidos los más utilizados son:

4.1.1 Método de las proporciones en medio de Lowenstein Jensen, es el recomendado para países de escasos o medios recursos. El resultado tarda hasta 4 semanas<sup>13</sup>

4.1.2 Sensibilidad en medios semisintéticos de Middlebrook. El resultado puede conocerse en 2-3 semanas<sup>13</sup>

4.1.3 Sistema E test. Utiliza tiras impregnadas con concentraciones crecientes de antimicrobianos. Las micobacterias se distribuyen en medio 7H11 de Middlebrook. Es un método rápido que proporciona resultados en una semana. Tiene inconvenientes en la interpretación de las diluciones y de la contaminación de las placas.<sup>13</sup>

4.2 Métodos líquidos. Tienen la ventaja de la rapidez de los resultados<sup>13,14</sup>

Bactec 12B rápido sencillo reproducible y concuerda con el método de las proporciones. Es el preferido en países industrializados que los cuales tienen bajas prevalencias de la enfermedad.

Existen otros sistemas líquidos (ESP II, MB-BacT, MGCIT, Bactec 9000MB), Métodos de microdilución en caldo, método de macrodilución, este último una adaptación de Bactec 460 para conocer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM) del M tuberculosis a diferentes drogas.

#### 4.3 Otras tecnologías:

4.3.1 Test de luciferasa. En este método las micobacterias vivas son infectadas por bacteriófagos TM4 que expresan el gen luciferasa y emite fotones. En el test, las bacterias sensibles infectadas por fagos no emitirán luz. El resultado es rápido.<sup>14</sup>

4.3.2 Sistema PhaB, que utiliza un micobacteriófago. Es un método rápido, no costoso y sencillo con adecuada concordancia para la rifampicina pero insuficiente para la Isoniacida.<sup>13,14</sup>

4.3.3 Citometría de Flujo. Es rápido, sencillo, sin embargo el costo del citómetro de flujo es elevado. Ha sido aplicado en el estudio de sensibilidad de micobacterias ambientales.

4.4 Estudio de sensibilidad mediante técnicas genéticas. Estos estudios requieren de infraestructura costosa, lo que reduce su uso a laboratorios de referencia e investigación;

##### 4.4.1. Detección rápida de resistencia.

Recientemente se están utilizando los Métodos Moleculares para la rápida detección de resistencias. Uno de los más prometedores utiliza la Reacción de Cadena de Polimerasa para detectar mutaciones en el gen *rpoB*, que está asociado a cepas resistentes a la rifampicina.<sup>13,14,25</sup>

En la mayoría de las instancias, la simple detección de resistencia a este medicamento puede ser indicación para utilizar medicamentos de segunda línea. Estas pruebas se consideran muy útiles en sitios de alta prevalencia de tuberculosis multi-drogaresistente (Federación de Rusia), por lo cual no se encuentra disponible para la mayoría de los países. Se puede considerar de utilidad cuando haya

recaídas o falla terapéutica después de un haber completado exitosamente el tratamiento.<sup>29-32</sup>

### 5.-Diagnóstico serológico de la tuberculosis

En las últimas dos décadas se han multiplicado los estudios investigando el valor de diferentes test en el diagnóstico de la tuberculosis probando diferentes antígenos con diferentes técnicas. La técnica de inmunoenzimología (ELISA) parece ser la que ofrece mayores ventajas. Los antígenos que ofrecen mejores ventajas son los de naturaleza proteica y lipídica. Se han utilizado como antígenos filtrados crudos de bacilos tuberculosos, PPD, antígeno 5 y 6 de M tuberculosis, glicolípidos micobacterianos SAG A1, B1 y C, factor cordón. La sensibilidad varía de acuerdo al antígeno, nivel de corte prevalencia de la enfermedad. Sin embargo el desconocimiento en cuanto a la dinámica de aparición de anticuerpos, su duración permanente después de haber sido curada la enfermedad, las reacciones cruzadas etc producen dificultades en la interpretación de los resultados. Los mayores logros en cuanto a sensibilidad se han logrado en casos de Tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva (65-85%) lo cual no brinda ventajas al manejo clínico, además la sensibilidad disminuye cuando se trata de baciloscopías negativas o tuberculosis extrapulmonar que son los casos donde se necesitan apoyo diagnóstico de otros test. Actualmente los test serológicos brindan apoyo en el diagnóstico de la tuberculosis solo en limitadas circunstancias.<sup>13</sup>

### 6.-Otras técnicas

#### 6.1 Detección de la infección.

Clásicamente se ha utilizado la prueba de tuberculina para detectar la infección; sin embargo la prueba no es específica, los resultados son variables dependiendo de factores como la experiencia técnica, la aplicación en masa de la BCG, la prevalencia de otras micobacteriosis.<sup>13</sup>

#### 6.2 Ensayos de liberación de citoquinas

Las guías recientes publicadas por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas y la CDC sugieren que no se realicen pruebas de detección de la infección por tuberculosis si no se tiene la intención de dar tratamiento. Esta estrategia puede ser ayudada por pruebas diagnósticas que no reaccionen con el Bacilo de Calmette Guérin. Es por este motivo que surgió esta prueba para detección de tuberculosis latente.<sup>31</sup> El nombre de la prueba es Quantiferon TB test (Cellestis), y está disponible en forma comercial. Ha sido aprobado por la Food and Drug

Administración de los Estados Unidos para el diagnóstico de tuberculosis latente.

El método es el siguiente se mezclan muestras de sangre con antígenos, incubándose por 16 a 24 horas. Los antígenos incluyen a la tuberculina y un antígeno para *Mycobacterium avium* intracelulare. Se incluyen controles de calidad. Si el paciente tiene infección por *M. Tuberculosis*, sus linfocitos CD4+ y CD8+ reconocerán la tuberculina y liberarán Interferón gamma. Los resultados están basados en la proporción de IFN-g liberado, y se realiza una radiografía de tórax para confirmar que la infección es latente. Comparado con la tuberculina, no requiere una segunda visita al médico para la interpretación de los resultados pero tiene en contra su complejidad y mayor costo. Esta prueba no debe ser utilizada en pacientes en quienes se sospecha la enfermedad por tuberculosis, infección por *M. avium*, embarazadas y, personas menores de 17 años (por falta de estudios).<sup>31</sup> En el presente se recomienda su uso para el tamizaje de pacientes con riesgo bajo o moderado de tuberculosis.<sup>32</sup>

### 6.3 - Deaminasa de adenosina,

Esta enzima interfiere en el metabolismo de las purinas, y su actividad ocurre principalmente en el tejido linfóide. La prueba tiene una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de tuberculosis pleural, con falsos positivos en casos de empiema, linfomas, o derrames pleurales en enfermedades autoinmunes. Es de utilidad en el diagnóstico de tuberculosis que afecta serosas de difícil acceso para biopsia, como meninges o pericardio.

Otros métodos son la determinación de la lisosoma en líquido de serosas y su cociente respecto a los niveles sericos, un cociente mayor de 1.2 tiene excelente sensibilidad y especificidad.<sup>13,14</sup>

## CONCLUSIONES

A pesar de los avances en el diagnóstico microbiológico en cuanto al advenimiento de cultivos de *M. tuberculosis* con técnicas que proporcionan mayor rapidez en los resultados, y técnicas de biología molecular que proporciona resultados en horas en cuanto a identificación del bacilo, estas ventajas no son de utilidad en las regiones que mayor necesidad tienen de ellas debido a los costos de la tecnología por lo que la estrategia para el control de la

enfermedad continúan siendo simple: detectar sintomático respiratorio, efectuar baciloscofia de inmediato y a la mañana siguiente y tratar bajo estrategia TAES aquellos con baciloscofia positiva.

## REFERENCIAS

- 1.- World Health Organization. *Groups at Risk: WHO Report on the Tuberculosis Epidemic*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1996.
- 2.- OPS. *Análisis de situación. Honduras 2003*. Consultado 5 junio 2003 en [http://: www.paho.org](http://www.paho.org)
- 3.- Ministerio de Salud. Honduras. *Programa Nacional contra la Tuberculosis*. 2004
- 4.- Kasper *et al.* *Principles of Internal Medicine*. 16ta ed. MacGraw-Hill, 2005. p 956-961.
- 5.- Mark J. Rosen *Chronic Cough Due to Tuberculosis and Other Infections: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines Chest* 2006; 129: 197S-201S
- 6.- Reina Valenzuela J. *Bosquejo histórico de la farmacia y la medicina en Honduras*. Talleres tipograficos Ariston. Tegucigalpa Honduras.1947.
- 7.- Varela- Martínez Cecilia. *Rasgos históricos de la lucha antituberculosa en Honduras*. Rev Med Hondur 2005;73( Supp2): S66-S80.
- 8.- Wikipedia. *La tinción de Ziehl Neelsen*. [En línea] consultado el 12,dic,2006 en [http://en.wikipedia.org/wiki/Ziehl-Neelsen\\_stain](http://en.wikipedia.org/wiki/Ziehl-Neelsen_stain)
- 9.- Tuberculosis Coalition for Technical Assistance. *International Standards for tuberculosis care*. [Online] consultado sept 19, 2006 en [http://www.stoptb.org/resource\\_center/assess/documents/istc\\_report.pdf](http://www.stoptb.org/resource_center/assess/documents/istc_report.pdf)
- 10.- Secretaria de Salud. República de Honduras. *Manual de normas de control de la tuberculosis*. Tegucigalpa. 2003.
- 11.- Hopewell P, Pai M, Dermot M, Uplekar M, RaviglioneMC. *International Standard for tuberculosis care*. Lancet Infect Disc 2006; 6:710
- 12.- Mase S, Neg V, Henry MC *et al.* *Yield of serial sputum smear examination in the evaluation of pulmonary tuberculosis: a systematic review*. Geneva, Switzerland: Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR), World Health Organization, And Foundation for innovative New Diagnostics, (FIND) 20053.
- 13.- Caminero Luna JA. *Métodos no convencionales y nuevas técnicas en diagnóstico de tuberculosis*. En: *Guía de la Tuberculosis para especialistas*. Cap 8. PARIS. Unión Internacional Contra Tuberculosis y Enfermedades respiratorias 2003. p 127-155)
- 14.- Fraser RS, Muller NL, Colman N, Pare PD. *Diagnóstico de las Enfermedades del Torax*. Micobacteriosis. Cap 27. Cuarta ed. BUENOS AIRES. Editorial Médica Panamericana. 2002. 837-838
- 15.- Heisenach KD, Care JH, Bates, and. Crawford JT. *Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis 1990; 161:977-981)
- 16.- Uptodate. Zaleznik DF. *Diagnosis of tuberculosis*.



- Uptodate[online]Ed 14.3.2006. Accesado el 19 dic 2006 en :[www/uptodate.com](http://www.uptodate.com)
- 17.- Piersimoni C and Scarparo C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; p. 41: 5355-5365.
  - 18.- Ausina V, Gamboa F, Gazopo E *et al.* Evaluation of the semiautomated Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1996-2002.
  - 19.- 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.
  - 20.- Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, and Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine bacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2049-2056.
  - 21.- Zahrani. Accuracy and Utility of Commercially Available Amplification and Serologic Tests for the Diagnosis of Minimal Pulmonary Tuberculosis. *Am J resp and crit care of med* 2000; 162.
  - 22.- Heifets L. Dilemmas and realities of rapid diagnostic test for Tuberculosis. *Chest* 2000; 118:4-5.
  - 23.- Della-Latta P, Whittier S. Comprehensive evaluation of performance, laboratory application, and clinical usefulness of two direct amplification technologies for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex. *Am J Clin Pathol* 1998;110:301-310.
  - 24.- Bergmann JS, Yuoh G, Fish G, Woods GL. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1419 – 1425.
  - 25.- Cantanzaro Antonino. Rapid diagnostic test for tuberculosis. Uptodate 2006. Ed 14.3 [Online] accesado el 12 de dic. 2006. E:\UpToDate® Rapid diagnostic tests for tuberculosis.htm
  - 26.- Cohen, RA, Muzaffar, S, Schwartz, D, *et al.* Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:156
  - 27.- Shah, S, Miller, A, Mastellone, A, *et al.* Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by the AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis polymerase chain reaction test. *Chest* 1998; 113:1190.
  - 28.- Pfyffer, GE, Kissling, P, Jahn, EM, *et al.* Diagnostic performance of amplified Mycobacterium tuberculosis direct test with cerebrospinal fluid, other non-respiratory, and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34:834.
  - 29.- Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49-593-594.
  - 30.- National Center for HIV, STD and the prevention: Division of tuberculosis elimination.[en linea] accesado el 13 de sept. 2005. Disponible en: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).
  - 31.- Centres for Disease Control and Prevention, “Guidelines for Using the Quanti FERON-TB test for diagnosing latent Mycobacterium Tuberculosis Infection”, *MMWR* 2003;52 (RR-02): 15-18.
  - 32.- Shluger. Changing approaches for the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;. 164: 2020-2024