

# Utilidad de una técnica de amplificación genética (LCx<sup>®</sup> MTB) para el diagnóstico de tuberculosis: resultados preliminares con muestras diferentes al esputo

M.C. Hernández Gracia, A. Torres Lana\*, M. Lecuona Fernández\*, C. Oliva Fernández\*\*, J. Batista Hernández, C. Casanova Hernández, C. Casanova Macario y A. Sierra López\*

Servicios de Neumología y \*\*Pediatria. Hospital de Nuestra Señora de la Candelaria. Santa Cruz de Tenerife. \*Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna.

**OBJETIVOS:** El objetivo de este trabajo ha sido evaluar una técnica de amplificación molecular comercializada (LCx<sup>®</sup> MTB, Abbott Diagnóstica) en el diagnóstico de tuberculosis con muestras diferentes al esputo.

**MATERIAL Y MÉTODO:** Hemos trabajado con 99 muestras, diferentes al esputo, pertenecientes a otros tantos pacientes (lavado broncoalveolar, líquido pleural y ascítico, muestras fecales, hemocultivos, biopsias de diferente procedencia, reacción en cadena de la polimerasa, líquido cefalorraquídeo, orina y jugo gástrico) y 14 esputos (10 con sospecha clínica de tuberculosis y cuatro procedentes de pacientes diagnosticados y tratados de tuberculosis de forma correcta al menos durante un mes). Todas las muestras se procesaron con el sistema LCx<sup>®</sup> MTB, según las instrucciones del fabricante. La referencia diagnóstica fue el medio Löwenstein-Jensen, y en los casos discrepantes se tuvo en cuenta el grado de sospecha clínica, la respuesta al tratamiento y la histología.

**RESULTADOS:** De las 99 muestras, siete fueron positivas con LCx y, de éstas, seis fueron Löwenstein-Jensen positivas y una no pudo ser valorada por contaminación del cultivo. Hubo un caso con Löwenstein-Jensen positivo y LCx negativo. Tan sólo una muestra presentó tinción de Ziehl-Neelsen positiva. Noventa y dos muestras fueron LCx negativas, no presentando crecimiento 91 de ellas. Estos datos otorgan una sensibilidad a la técnica del 86% y una especificidad del 98%. Hubo 4 casos de micobacterias atípicas, con LCx negativo en todas ellas.

**CONCLUSIONES:** El sistema LCx permite un diagnóstico de tuberculosis con muestras diferentes al esputo sencillo, rápido, sensible y específico.

**Palabras clave:** Tuberculosis. Esputo. Amplificación molecular.

(Arch Bronconeumol 1999; 35: 79-83)

The usefulness of a gene amplification diagnostic technique (LCx<sup>®</sup>MTB) for tuberculosis: preliminary results with non-sputum samples

**OBJECTIVE:** To evaluate the use in non-sputum samples of a commercial molecular amplification kit (LCx<sup>®</sup>MTB, Abbott Diagnostica) (LCx) for the diagnosis of tuberculosis.

**MATERIAL AND METHOD:** Ninety-nine non-sputum samples from the same number of patients (bronchoalveolar, pleural and ascitic fluid, fecal samples, blood cultures, biopsies from different sites, cerebrospinal fluid, urine and gastric juices) and 14 sputum samples (10 from patients clinically suspected of having tuberculosis and 4 from patients diagnosed of tuberculosis and undergoing appropriate treatment for at least one month). All samples were LCx processed according to the manufacturer's instructions. The reference diagnosis was obtained by the Löwenstein-jensen method and when results were inconsistent, we took into account the degree of clinical suspicion, response to treatment and histology.

**RESULTS:** Seven of the 99 samples were positive by the LCx technique, and 6 of the 7 were also LJ positive; 1 could not be evaluated because of culture contamination. One LJ positive culture was LCx negative. Only one sample was positive by Ziehl-Neelsen (ZN) staining. Ninety-two samples were LCx negative, with 91 showing no growth at all. Sensitivity was 86% and specificity 98%. Atypical mycobacteria were detected in 4 cases, all of which were LCx negative.

**CONCLUSIONS:** Diagnosis of tuberculosis by applying the LCx system to various types of samples other than sputum is simple, rapid, sensitive and specific.

**Key words:** Tuberculosis. Sputum. Molecular amplification.

## Introducción

El diagnóstico de la tuberculosis se caracteriza por padecer de cierta lentitud, sobre todo en formas extra-

pulmonares. Estas formas clínicas suelen ser poco bacilíferas, y en ellas la tinción de Ziehl-Neelsen es con frecuencia negativa, por lo que es necesario esperar, para llegar al diagnóstico definitivo, al crecimiento, generalmente tras varias semanas, en los medios de cultivos adecuados<sup>1</sup>.

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido el diagnóstico más sensible y rápido de ciertas enfermedades. El uso de las técnicas de amplificación para el

Correspondencia: Dra. M.C. Hernández Gracia. Serrano, 7, 3.ª dcha. 38004 Santa Cruz de Tenerife. E-mail: atlana@ull.es

Recibido: 11-5-98; aceptado para su publicación: 15-9-98.

diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras respiratorias ha ofrecido resultados esperanzadores, incluso en pacientes infantiles<sup>2-6</sup>. Sin embargo, la experiencia con muestras de origen diferente al esputo es escasa.

El sistema LCx<sup>®</sup> MTB, Abbott Diagnóstica, es un sistema que se basa en la reacción en cadena de la ligasa para detectar la presencia de ADN y ya ha sido evaluado para otro tipo de microorganismos<sup>7</sup>. Así mismo, ha sido usado para diagnosticar tuberculosis, principalmente en esputos<sup>8,9</sup>.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad del sistema comercial LCx<sup>®</sup> MTB, Abbott Diagnóstica, en el diagnóstico de la tuberculosis, usando muestras clínicas diferentes al esputo.

## Material y método

### Muestras clínicas

Se han estudiado 99 muestras clínicas diferentes al esputo, pertenecientes a 99 pacientes de los Servicios de Neumología del Hospital Universitario de Canarias y de Neumología y Pediatría del Hospital Nuestra Señora de la Candelaria. Las características de estas muestras y de los pacientes se exponen en la tabla I. Se evaluaron también 14 esputos, de los cuales 10 pertenecían a pacientes con sospecha clínica de tuberculosis y los otros 4 esputos procedían de pacientes ya diagnosticados de tuberculosis, con un cultivo en medio sólido positivo y en tratamiento tuberculostático correcto con al menos un mes de cumplimiento del mismo.

### Método de descontaminación

Todas las muestras se procesaron el mismo día de su llegada al laboratorio. Las muestras se descontaminaron con N-acetilcisteína-NaOH<sup>10</sup>. En todos los casos, la mitad del sedimento resultante se sembró en medio de Löwenstein-Jensen, y se conservó a -20 °C la otra mitad hasta la realización del ensayo de LCx<sup>®</sup> MTB.

### Ensayo con LCx<sup>®</sup> MTB

Las muestras se procesaron para el sistema LCx<sup>®</sup> MTB siguiendo las instrucciones del fabricante para muestras respiratorias, ya que no existen protocolos específicos sobre la manera de procesar otro tipo de muestras. El ensayo consiste en tres pasos diferentes:

1. Extracción de inhibidores de la muestra, que se realiza con *buffer* de resuspensión de muestras respiratorias de LCx (LCx Respiratory Specimen Resuspension Buffer) y extracción del ADN bacteriano por lisis mecánica (LCx Lysor).

2. Amplificación específica del fragmento del ADN estudiado. El fragmento amplificado corresponde al gen encargado de codificar la proteína antígeno b de 38 kD, que es específico de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>11</sup>. La amplificación se lleva a cabo en un tubo de amplificación propio del sistema (LCx Tuberculosis Amplification Vial), que contiene los elementos necesarios para la misma. El protocolo del termociclador es el siguiente: 94 °C durante un segundo, 55 °C durante un segundo y 69 °C durante 40 segundos. El número de ciclos es de 37.

3. Detección del producto amplificado, que en este caso no es visual, sino a través de un enzoinmunoanálisis automatizado y de lectura objetiva (LCx Reaction Cell y LCx Analy-

TABLA I  
Distribución de muestras

20 lavados broncoalveolares
19 orinas
17 jugos gástricos
15 líquidos pleurales
11 biopsias
8 LCR
4 líquidos ascíticos
3 muestras fecales
2 hemocultivos*

\*Previo procesamiento por un sistema automático de hemocultivos (BACTEC). Las muestras fecales y de hemocultivos procedían de pacientes VIH+. Las 11 biopsias se distribuían así: 7 biopsias ganglionares (de pacientes VIH+), 2 biopsias cutáneas, 2 biopsias pleurales y una biopsia paracostal. LCR: líquido cefalorraquídeo.

TABLA II  
Distribución de resultados del LCx

Tipo de muestra	LCx positivo	LCx negativo
Lavado broncoalveolar	0	20
Orina	0	19
Jugo gástrico	0	17
Líquido pleural	3	12
Biopsia	2	9
LCR	0	8
Líquido ascítico	0	4
Heces	1	2
Hemocultivo	1	1
Total	7	92

LCR: líquido cefalorraquídeo.

zer). El valor umbral de positividad de una muestra se establece hallando el 30% de la media de los dos calibradores utilizados en cada tanda de trabajo. Así mismo, se utilizaron siempre controles positivos y negativos en cada sesión de trabajo.

### Tinción y cultivo

Todas las muestras se tiñeron con la tinción de Ziehl-Neelsen y se sembraron en medio sólido de Löwenstein-Jensen, que sirvió como técnica de referencia diagnóstica.

## Resultados

### Muestras diferentes al esputo

De las 99 muestras que se estudiaron, en siete se aisló *Mycobacterium tuberculosis* en el cultivo. De éstas, seis fueron positivas con el LCx (tabla II). La muestra que resultó negativa para LCx y positiva con el medio de Löwenstein-Jensen correspondía a una biopsia pleural de un paciente con diagnóstico de derrame pleural en estudio. Al paciente se le realizaron varias biopsias pleurales percutáneas que por su pequeño tamaño no se pudieron fragmentar, de manera que una de estas muestras se remitió para el estudio microbiológico para tinción y cultivo y a otro fragmento se le realizó el LCx. Al no tratarse de la misma muestra, no se puede asegurar que ambas fueran pleurales, es decir, que fueran muestras óptimas, por lo que la comparación de los resultados por los distintos métodos puede ser difícil de establecer.

Hubo un séptimo caso con LCx positivo en el que el cultivo se contaminó, por lo que no podemos valorar el resultado de éste. Se trataba de una paciente con una masa paracostal de la que se realizó una biopsia quirúrgica, y se observó durante la intervención la liberación de una gran cantidad de material semejante al cáseum. La paciente fue tratada con tuberculostáticos con curso clínico favorable, por lo que esto nos induce a pensar que realmente se trataba de un caso de tuberculosis, el octavo de la serie, como así parecía indicar el resultado del LCx.

En 4 casos se aislaron micobacterias no tuberculosas: *M. chelonae*, *M. avium-intracellulare* y dos micobacterias atípicas no identificadas. El LCx en todos estos casos fue negativo.

En resumen, hubo 87 casos con todas las técnicas negativas, cuatro con crecimiento para micobacterias atípicas y LCx negativo, un caso con sólo LCx positivo, otro que presentaba únicamente crecimiento en medio de Löwenstein-Jensen y 6 muestras con crecimiento y resultado de LCx positivos (tabla III).

De las 7 muestras con aislamiento en medio de Löwenstein-Jensen, sólo una de ellas fue Ziehl-Neelsen positiva.

Como resultado, y descartando como tuberculosis el caso sin crecimiento al valorar como técnica de referencia el cultivo en medio sólido, el LCx demuestra en nuestra serie una sensibilidad del 86% (6 muestras positivas sobre 7 casos confirmados) y una especificidad del 98,9% (91 muestras negativas sobre 92 casos sin crecimiento, una vez excluidas las cuatro micobacterias atípicas).

#### Muestras de esputo

De los 10 esputos analizados con sospecha clínica de tuberculosis, seis de ellos presentaron todas las pruebas diagnósticas negativas: tinción, cultivo y LCx. Los cuatro restantes tuvieron crecimiento en medio de Löwen-

stein-Jensen y el resultado del LCx fue, así mismo, positivo. Sólo en dos de estos casos la tinción de Ziehl-Neelsen fue positiva.

Los 4 esputos procedentes de pacientes con al menos un mes de tratamiento tuberculostático correcto y con buen cumplimiento fueron negativos en todas las técnicas (tabla IV).

#### Discusión

Uno de los problemas que plantea el diagnóstico de tuberculosis es el lento metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*, que exige esperar al menos 8 semanas a la hora de descartar un cultivo como negativo<sup>12</sup>. Este inconveniente se acrecienta en muestras no respiratorias, en las que el número de micobacterias es muy bajo y escapa a la sensibilidad de la tinción. En estas muestras, las técnicas de amplificación genética, de elevada sensibilidad, pueden desarrollar todo su potencial diagnóstico con mayor rendimiento<sup>3,13,14</sup>. Sin embargo, existe poca experiencia en la aplicación de esta tecnología con muestras diferentes al esputo y más aún con sistemas estandarizados, dado que los que están comercializados se han diseñado para este tipo de muestra.

El sistema LCx<sup>®</sup> MTB es uno de estos ensayos estandarizados y de ejecución sencilla. Nuestros resultados, usando incluso el protocolo del fabricante para muestras de esputo, ponen de manifiesto una especificidad muy elevada del 98,9%, al igual que los de otros autores<sup>15,16</sup>.

La sensibilidad obtenida, del 86%, puede ser más alta de la señalada si se consideran algunos aspectos de las 2 muestras discrepantes. En un caso en el que el LCx fue positivo, pero el cultivo se contaminó, el aspecto clínico de la lesión, así como la historia de la paciente, la histología y la respuesta al tratamiento indican la existencia de una tuberculosis en la pared costal. Si lo consideramos como verdadero positivo correspondería al octavo caso de tuberculosis (siete con crecimiento y este caso), y la sensibilidad aumentaría al 87,5% (7 casos de ocho).

En el otro caso discrepante, el resultado negativo del LCx podría haber sido debido bien a un fallo diagnóstico del sistema por presencia de inhibidores en la muestra, o bien a una muestra no adecuada. En el primer supuesto, su detección en las muestras no respiratorias puede llegar a ser de hasta el 20%<sup>17</sup>. El sistema LCx<sup>®</sup> MTB no permite detectar su presencia. Sin embargo, el equipo Cobas Amplicor<sup>®</sup> PCR de Laboratorios Roche, sistema que posee un control de amplificación interna para cada muestra, sí facilita la monitorización de factores inhibidores de las muestras clínicas<sup>18</sup>.

TABLA III  
Resultados globales según la técnica diagnóstica

Resultado de cultivo	Tinción	LCx <sup>®</sup> MTB	
		Positivo	Negativo
Positivo (n=7)	Positiva	1	0
	Negativa	5	1
Contaminado (n=1)	Positiva	0	0
	Negativa	1	0
Negativo para <i>M. tuberculosis</i> (n=87)	Positiva	0	0
	Negativa	0	87
Positivo para micobacterias atípicas (n=4)	Positiva	0	2
	Negativa	0	2

TABLA IV  
Comparación de los resultados obtenidos por diferentes técnicas con esputos

Esputos	Tinción de Ziehl-Neelsen		Medio de Löwenstein-Jensen		LCx	
	Positiva	Negativa	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
10 sospechas clínicas	2	8	4	6	4	6
4 postratamiento	0	4	0	4	0	4

TABLA V  
Comparación entre el tiempo de crecimiento en medio sólido y la tinción para detectar la presencia de *M. tuberculosis* en 8 casos

Número de caso	Tipo de muestra	Crecimiento en medio de Löwenstein-Jensen (tiempo en semanas)	Tinción de Ziehl-Neelsen
1	Líquido pleural	7	Negativa
2	Líquido pleural	5	Negativa
3	Líquido pleural	5	Negativa
4	Hemocultivo	6	Negativa
5	Heces	4	Negativa
6	Biopsia ganglionar	3	Positiva
7	Biopsia paracostal	Contaminado	Negativa
8*	Biopsia pleural	4	Negativa

\*LCx negativo.

Por otro lado, pudiera ser que la muestra no tuviera realmente pleura, o bien que la heterogeneidad de la distribución de las micobacterias en las serosas explicase que en el fragmento pleural analizado no hubiera micobacterias<sup>2,15,19</sup>. Esto último nos hace pensar que en las formas pleurales sería conveniente enviar, al menos para el estudio molecular, varios fragmentos de distintas localizaciones.

Es necesario evaluar también la rapidez en el establecimiento del diagnóstico. Al observar los datos de la tabla V, vemos cómo de los 7 casos con cultivo positivo tan sólo en uno la tinción de Ziehl-Neelsen fue diagnóstica, por lo que en todos los casos restantes habría que haber esperado un mínimo de 3 semanas y un máximo de siete para comenzar a tratar al paciente. Con la técnica molecular, el tiempo que se tarda en procesar una muestra (incluyendo las incubaciones) es de 7-8 h, pero el procedimiento está diseñado para ser ejecutado, si se desea, en dos jornadas distintas de trabajo, existiendo un paso que se puede dejar realizándose a lo largo de la noche.

A lo largo de nuestro estudio, hemos observado otros dos factores de relevancia. El primero se refiere a los casos de micobacteriosis atípicas, donde el cultivo fue positivo y el LCx negativo, indicando la correcta especificidad en la amplificación, pudiendo diferenciar entre micobacteriosis tuberculosa y atípica. En su vertiente clínica, esta observación permite orientar hacia esta posibilidad a aquellos casos con tinción positiva y LCx negativo, a la espera del crecimiento de la micobacteria. Este factor ha sido observado por otros autores con el mismo sistema que el usado por nosotros<sup>9,16,20</sup>.

El otro factor observado lo constituyen los casos con tuberculosis ya diagnosticada y en tratamiento. En nuestro estudio, los 4 casos fueron negativos con todos los métodos, aunque se trata de una serie muy corta. Con mayor número de casos, Kennedy et al sí observan cierta utilidad en la aplicación de esta técnica en la valoración de la respuesta a la terapia antituberculosa, mientras que otros autores encuentran resultados positivos a pesar de la esterilización de los cultivos después de un tratamiento correcto<sup>20,21</sup>. Estas discre-

pancias hacen necesario diseñar estudios que aclaren si las técnicas de detección de ADN tienen algún papel en el control de la eficacia del tratamiento, si bien su alta sensibilidad, su capacidad de detectar ADN de bacterias no viables y su coste no parecen otorgarle este papel.

En conclusión, es posible afirmar que el sistema LCx<sup>®</sup> MTB puede ser aplicado a muestras diferentes al esputo con un buen rendimiento diagnóstico. Al ser un sistema comercial, es de ejecución fácil y sencilla, además de rápido, sensible y específico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chain K. Clinical microscopy. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editores. Manual of clinical microbiology (6.ª ed.). Washington, DC: American Society of Microbiology, 1995; 33-51.
- Brisson-Noël A, Gicquel B, Lecossier D, Lèvy-Frèbault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; 2: 1.060-1.071.
- Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Noriega AR. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 1.019-1.021.
- Querol JM, García de Lomas J. ¿Debemos introducir la prueba de amplificación enzimática de ADN (PCR) en el diagnóstico de la tuberculosis? Enferm Infecc Microbiol Clin 1993; 11: 61-64.
- Chin DP, Yajko DM, Hadley WK, Sanders CA, Nassos PA, Madej JJ et al. Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: 1.872-1.877.
- Gómez-Pastrana Durán D, Caro Mateo P, Torrontera Santiago R, Anguita Quesada MM, López Barrio AM, Andrés Martín A et al. Tomografía computarizada y reacción en cadena de la polimerasa en la infección tuberculosa de la infancia. Arch Bronconeumol 1996; 32: 500-504.
- Buimer M, Van Doornum GJJ, Ching S, Peerbooms PGH, Klier PK, Ram D et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by ligase chain reaction-based assays with clinical specimens from various sites: implications for diagnostic testing and screening. J Clin Microbiol 1996; 34: 2.395-2.400.
- Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L 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: 1.996-2.002.
- Lindbråthen A, Gaustad P, Hovig B, Tønjum T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples from patients in Norway by ligase chain reaction. J Clin Microbiol CDC, 1997; 35: 3.248-3.253.
- Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Atlanta, Georgia: Public Health Service, US Department of Health and Human Services. CDC, 285.
- Andersen AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein b, a 38.000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1989; 57: 2.481-2.488.
- Wayne LG. Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for research purposes. En: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994; 73-83.
- Schluger NW, Kinney D, Harkin TJ, Rom WN. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. Chest 1994; 105: 1.116-1.121.
- Godfrey-Faussett P. Molecular diagnosis of tuberculosis: the need for new diagnostic tools. Thorax 1995; 50: 709-711.

15. Querol JM, Mínguez J, García-Sánchez E, Farga MA, Gimeno C, García de Lomas J. Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by polymerase chain reaction. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1.977-1.981.
16. Gamboa F, Padilla E, Manterola JM, Gazapo E, Lonca J, Matas L et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in nonrespiratory specimens by ligase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1.324-1.329.
17. Kirschner P, Rosenau J, Springer B, Teschner K, Feldmann K, Böttger EC. Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-months prospective study. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 304-312.
18. Pasternack R, Vuorinen P, Pitkälä T, Koskela M, Miettinen A. Comparison of Manual Amplicor PCR, Cobas Amplicor PCR and LCx Assays for detection of *Chlamydia trachomatis* infection in women by using urine specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 402-405.
19. Brisson-Noël A, Aznar CH, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli R et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; 338: 364-366.
20. Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2.424-2.426.
21. Kennedy N, Gillespie SH, Saruni AOS, Kisyombe G, McNerney R, Ngowi FI et al. Polymerase chain reaction for assessing treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *JID* 1994; 170: 713-716.