



FACULTAD DE
MEDICINA
UNIVERSIDAD DE
CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Utilidad de las técnicas de amplificación genética en el diagnóstico de la tuberculosis.

Usefulness of the genetic amplification tools in the diagnosis of tuberculosis.

Autor: D. Pablo Andrés Sacristán

Director: D. Jesús Agüero Balbín

Codirectora: Dña. Inmaculada Pérez del

Molino

Santander, Junio de 2017

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
PARTE TEÓRICA	4
1 Introducción	4
1.1 La enfermedad	4
1.2 Incidencia y mortalidad de la tuberculosis.....	4
1.3 Tuberculosis y VIH	6
2 Mycobacterium tuberculosis	7
2.1 Características	7
2.2 Exposición e infección	8
2.3 Tratamiento.....	10
2.4 Resistencias.....	10
3 Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis	11
3.1 Muestras.....	11
3.1.1 Muestras respiratorias	11
3.1.2 Muestras extrarrespiratorias	12
3.2 Métodos diagnósticos	12
3.2.1 Microscopía	12
3.2.2 Cultivo	14
3.3 Identificación de Mycobacterium tuberculosis (MTB).....	17
3.3.1 Métodos no moleculares	17
3.3.2 Métodos moleculares.....	18
3.4 Pruebas de sensibilidad a fármacos	26
3.4.1 Técnicas fenotípicas	28
3.4.2 Técnicas genotípicas.....	30
4 Epidemiología de la infección por MTB	32
4.1 Tipificación molecular	32
5 Diagnóstico de infección latente	33
5.1 Prueba de la tuberculina	34
5.2 Técnicas de detección de interferón.....	36
6 Niveles de los laboratorios de micobacteriología	37
Nivel 1.....	37
Nivel 2.....	38
Nivel 3.....	38

PARTE EXPERIMENTAL	38
1 Objetivos	38
2 La Sección de Micobacterias del HUMV	39
2.1 Infraestructura y dotación.....	39
2.2 Cartera de servicios.....	39
2.2.1 A) Diagnóstico de la infección tuberculosa	39
2.2.2 B) Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa y micobacteriosis	39
3 Material y Métodos.....	40
3.1 Diseño.....	40
3.2 Muestras.....	41
3.2.1 Análisis de la muestra.....	41
3.2.2 Análisis estadístico	42
4 Resultados y Discusión	43
5 Conclusiones y comentarios finales.....	49
6 Limitaciones del estudio	50
7 Anexo 1	50
8 Bibliografía	54
9 Agradecimientos	57

RESUMEN

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que se conocen. Durante años ha sido estudiada para entender su comportamiento y poder diseñar estrategias que puedan hacerle frente. Bajo el liderazgo de la OMS, se han lanzado programas a escala global con el objetivo de implantar las mejores técnicas diagnósticas y terapéuticas en todos los puntos del planeta. Se han redactado guías clínicas en las que se recogen las indicaciones y los beneficios de las numerosas pruebas diagnósticas desarrolladas hasta la fecha, pero su aplicación está condicionada por el entorno local y por la disponibilidad de medios del laboratorio clínico. El objetivo de este estudio ha sido revisar la literatura reciente sobre las técnicas diagnósticas disponibles, especialmente en lo referente a técnicas de amplificación genética, y evaluar el rendimiento de estas pruebas en nuestro medio tras estudiar un número de 1043 muestras seleccionadas y que fueron procesadas por el Servicio de Microbiología del HUMV, entre el 2011 y el 2016.

Palabras clave: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, laboratorio, PCR.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the oldest diseases ever known. For many years, it has been studied to understand its behaviour and, so, to be able to design strategies that can face it. Under the leadership of the WHO, global scale programs have been launched with the aim of setting up the best diagnostic tools and treatments in every corner of the planet. Clinical guides have been written where the indications and benefits of all diagnostic tools known are given, but their application is conditioned by the local environment and the infrastructure available in the clinical laboratory. The aim of this study was to accomplish a full review of the published literature about the diagnostic tools available, paying special attention to the genetic diagnostic tools, and to evaluate their usefulness in our local environment by studying a total of 1043 selected samples which were processed in the Microbiology Service of the HUMV, between 2011 and 2016.

Key words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, laboratory, PCR.

PARTE TEÓRICA

1 Introducción

1.1 La enfermedad

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa responsable de uno de los mayores problemas de salud pública a gran escala y, por tanto, uno de los problemas prioritarios para la OMS. En 2015 se la encuadró en el ranking de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial, por encima del VIH/SIDA como causa debido a enfermedad infecciosa (1). Las características intrínsecas de esta infección, tales como su transmisión aérea, la instauración progresiva de su clínica y la capacidad latente explican la dificultad de controlar su propagación (2).

En octubre de 2015 se dieron por alcanzados los Objetivos del Milenio relacionados con la tuberculosis, consiguiéndose que se redujera la mortalidad y la incidencia en un 47 % y un 42%, respectivamente, durante el periodo de 1990-2015 (1). A pesar de estos esperanzadores resultados, queda mucho trabajo por hacer ya que la incidencia y mortalidad de esta enfermedad sigue siendo notablemente alta, a pesar de disponer de tratamientos efectivos. A esta realidad se ha sumado una nueva amenaza, como son los casos de tuberculosis multirresistente (TB-MR) y extremadamente resistente (TB-XR), los cuales ya no están limitados a países en vías de desarrollo debido a la movilidad actual de las personas y el fenómeno de globalización (3).

Con el fin de atajar esta situación se han desarrollado múltiples herramientas diagnósticas para conseguir una detección precoz, tanto de la infección como de la enfermedad. Entre ellas, el incremento del abanico de técnicas moleculares ha supuesto un considerable avance, aunque la aplicación de las mismas difiere de manera considerable en función del nivel socioeconómico de la región. Pese a todo, todavía no se ha encontrado suficiente evidencia de que todas estas técnicas superen al *gold standard* que hoy por hoy sigue siendo el cultivo del microorganismo responsable.

Este trabajo consta de dos objetivos principales: el primero es hacer una revisión del conjunto de técnicas diagnósticas conocidas hasta la fecha y su aplicación directa en cuanto a la prevención y tratamiento de la tuberculosis, y el segundo de una parte experimental para evaluar la aplicación y rendimiento de dichas técnicas en nuestro medio, con especial atención a las técnicas de amplificación genética.

1.2 Incidencia y mortalidad de la tuberculosis

La tuberculosis sigue siendo un problema de primer orden, por mucho terreno que se esté ganando aparentemente. La realidad del problema se ve tremendamente magnificada por el nivel socioeconómico de la región en la que nos encontremos. Lo dramático de esta enfermedad es que tenemos tratamientos óptimos y los conocimientos suficientes para enfrentarnos a ella, no es en vano uno de los azotes más antiguos de la humanidad, pero los abismos que existen entre los sistemas sanitarios de primer nivel y los existentes las zonas con tasas de incidencia más altas hacen que miles de personas se enfrenten a este estigma con recursos más que insuficientes.

	Número de casos de TBC	Incidencia de la TBC (100.000 habitantes/año)	Número de casos de TBC (VIH +)	Incidencia de la TBC (100.000 habitantes/año) (VIH +)
Bajo nivel de ingresos	1 480 000 [1 310 000 - 1 650 000]	232 [205-259]	311 000 [257 000-365 000]	49 [40-57]
Nivel de ingresos bajo-medio	6 680 000 [5 030 000 - 8 330 000]	228 [172-285]	484 000 [395 000-573 000]	17 [14-20]
Nivel de ingresos medio-alto	2 090 000 [1 860 000 - 2 320 000]	81 [72-89]	367 000 [266 000-469 000]	14 [10-18]
Nivel de ingreso alto	143 000 [138 000 - 148 000]	12 [12-13]	4 600 [4 400-4 800]	0.4 [0.38-0.42]
Global	10 400 000 [8 740 000 - 12 200 000]	142 [119-166]	1 170 000 [1 020 000-1 320 000]	16 [14-18]

Figura 1. Incidencia de la tuberculosis según nivel de ingresos en 2015 a nivel mundial (4).

	Número de muertes debido a TBC, excluyendo VIH	Muertes debido a TBC en población VIH – (100.000 habitantes/año)
Bajo nivel de ingresos	230 000 [190 000 - 260 000]	36 [30-41]
Nivel de ingresos bajo-medio	1 000 000 [860 000 - 1 200 000]	36 [30-41]
Nivel de ingresos medio-alto	130 000 [120 000 - 130 000]	4.8 [4.5-5.1]
Nivel de ingreso alto	12 000 [11 000 - 12 000]	1.0 [0.9-1.0]
Global	1 400 000 [1 200 000 - 1 600 000]	19 [17-21]

Figura 2. Mortalidad de la tuberculosis según nivel de ingresos en 2015 a nivel mundial (5).

A la vista de los datos aquí presentados (figura 1 y 2), se puede deducir que el nivel socioeconómico es capital a la hora de combatir la enfermedad. Disponemos de muchos recursos y herramientas, pero de difícil implantación técnica y económica en las zonas donde son más necesarios.

España está considerada como un país de baja incidencia ya que su tasa es inferior a 20 casos por 100.00 habitantes. En cuanto a Cantabria, la tasa de incidencia es superior a la nacional, aunque esto se podría explicar debido a que la población rural aún es muy numerosa. Los principales focos de tuberculosis de nuestra nación se localizan en ambas ciudades autónomas, Ceuta (29,67) y Melilla (40,46), y en Galicia, con una tasa de incidencia de 19,96 casos por 100.000 habitantes (6).

	Número de casos de TBC	Incidencia de la TBC (100.000 habitantes/año)
Unión Europea	333.000	37
España	5.018	10,8
Cantabria	66	11,19

Figura 3. Casos declarados de tuberculosis y tasas de incidencia del año 2014 (6).

1.3 Tuberculosis y VIH

La pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha supuesto un antes y un después en la historia de la tuberculosis, ya que ambas infecciones suponen una combinación potencialmente mortal. En 2015 un 35% de los fallecimientos en población VIH positiva fue a causa de la tuberculosis (7).

La infección crónica por el VIH y la depleción de los linfocitos T que provoca podría decirse que está hecha a medida del progreso de la infección por *M. tuberculosis*, debido a que la disfunción de la inmunidad celular hace que sea imposible contener la infección causada por el microorganismo. Esta relación es tan estrecha que la tuberculosis supone un evento definidor de sida. Este factor actualmente determina una nueva brecha entre los países en vías de desarrollo y los países desarrollados, ya que la dificultad de acceder a las terapias antirretrovirales hace que la población de estos países empobrecidos sufra las consecuencias de este estigma de una manera mucho más contundente.

En conclusión, la población poco instruida en cuanto a la prevención de la infección por VIH, o que no dispone de recursos para ello, hace que la propagación del virus resulte mucho más sencilla, convirtiéndoles en sujetos muy vulnerables a la tuberculosis y perpetuando el problema. Por ello, en las zonas más deprimidas del planeta es donde residen las mayores tasas de incidencia de VIH y tuberculosis, tal y como se ve reflejado en los datos de la figura 2, ya que de los 1.170.000 nuevos casos de tuberculosis en población VIH positiva recogidos durante 2015, 795.000 se dieron en países con rentas de nivel bajo-medio o muy bajo (4).

En cuanto a los sistemas sanitarios de primer orden, el concepto de la inmunosupresión ha replanteado el control de los pacientes tuberculosos o de la población con un mayor riesgo potencial. El hecho de que las terapias antirretrovirales permitan un control efectivo de la infección por VIH evita en gran medida la vulnerabilidad de estos pacientes. También su seguimiento más exhaustivo, permitiendo que se propicien diagnósticos más precoces. Por lo tanto, el problema que se puede plantear es que un paciente no sepa que se ha infectado con el virus y desarrolle una tuberculosis que puede ser más grave, ya que los porcentajes de tuberculosis extrapulmonar son mayores que en la población general y la respuesta será peor al tratamiento, a menos que se recuperen los niveles de linfocitos T (por encima de 500 cel/uL). Pero si un paciente VIH+ está bien controlado y se consigue controlar la inmunosupresión, esta situación puede ser evitada.

Por último, es necesario recalcar que esta coinfección interfiere de manera muy significativa con la rentabilidad diagnóstica de las pruebas que aplicamos, alterando la sensibilidad de las mismas y siendo responsable de un buen número de falsos negativos en aquellos pacientes no conocedores de su infección por el VIH. Durante el desarrollo de los próximos puntos lo iremos destacando de manera más específica, pero es fácil deducir que en aquellas zonas con recursos más escasos en los que solo disponen de las pruebas diagnósticas básicas de primera línea, es posible que exista un porcentaje de pacientes infradiagnosticados. Por el contrario, en zonas más desarrolladas con mayor disponibilidad de recursos hay que estar especialmente atentos frente a pacientes VIH+ y tener en mente que quizás sean necesarios estudios más específicos para diagnosticar la tuberculosis.

2 *Mycobacterium tuberculosis*

2.1 Características

El bacilo de la tuberculosis fue descubierto por Robert Koch en 1882 (bacilo de Koch), y Zopf le asignó el nombre de *Mycobacterium tuberculosis* al año siguiente, al demostrar que se trataba del agente etiológico de la enfermedad. Está incluido en el género *Mycobacterium*, en el que se incluyen así mismo un buen número de especies ambientales y no patógenas (micobacterias no tuberculosas), y forma parte del denominado complejo *M. tuberculosis*, en el que se incluyen, además, otras 5 especies: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium canetti* (2).

Se trata de un patógeno gram positivo y aerobio, por lo que tiene tropismo hacia tejidos bien oxigenados, siendo los alvéolos una localización perfecta para asentar una infección por este bacilo. Es inmóvil e intracelular obligado y desencadena una respuesta inmunitaria celular. Su ritmo de división (cada 18-20 horas) es especialmente lento, lo que dificulta su cultivo (2). No forma esporas, pero son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo adheridos a objetos inanimados ya que tienen una elevada resistencia a los ácidos, los álcalis y los desinfectantes. También hay que reseñar su capacidad para aguantar tanto la desecación como la congelación, aunque la exposición a la luz ultravioleta y al calor (>65° durante 30 minutos) es capaz de inactivarlo (8). Las micobacterias tuberculosas tienen unas características fenotípicas casi idénticas y una homología en su DNA mayor del 95% (8). Es importante distinguir el agente responsable de una tuberculosis, ya que a pesar de ser *M. tuberculosis* el principal agente implicado,

en ocasiones hay que descartar que se trate de algún otro miembro del complejo el responsable de la infección, especialmente *M. bovis* por su resistencia intrínseca a la pirazinamida (8).

2.2 Exposición e infección

La tuberculosis se transmite de persona a persona por vía aérea. Un paciente bacilífero es el que infecta a otro que haya estado en contacto estrecho y que acabe inhalando un aerosol (gotas de Flügge) en el que se encuentren suspendidos los bacilos (9). El siguiente paso será alcanzar los pulmones dónde se asentará y comenzará a multiplicarse, aunque lo normal es que los bacilos sean fagocitados y destruidos por los macrófagos en el mismo alvéolo. Por lo tanto, de los pacientes expuestos al patógeno, aproximadamente un 10% desarrollará la infección y dentro de este grupo, el 50% lo hará de manera inmediata y el otro 50% la sufrirá al producirse una reactivación endógena de una lesión con bacilos viables tras un prolongado tiempo de latencia.

El curso de la infección comienza tras la entrada en contacto del *M. tuberculosis* con los alvéolos respiratorios, desatando una batería de reacciones tisulares e inmunológicas que conforman la primoinfección. Así, se puede establecer una primera fase local en la que se produce un foco de alveolitis exudativa en el que los macrófagos intentan destruir a los bacilos invasores. Generalmente se consigue contener el proceso en este punto, pero si la infección continúa propagándose puede extenderse por los ganglios linfáticos regionales (paratraqueales o mediastínicos) estableciéndose el complejo bipolar (10). La localización pulmonar es la más habitual, pero se ha de tener en cuenta que cualquier órgano puede ser afectado.

Tras un periodo de 2 y 10 semanas se genera la respuesta inmunitaria celular, tras haber sido procesados los antígenos correspondientes a la micobacteria. Gracias a ésto los linfocitos T son capaces de reconocer la agresión por parte del bacilo y liberar citocinas que repercuten sobre los macrófagos, transformándolos en las células gigantes de Langhans que, al concentrarse de manera concéntrica al foco de infección, junto a los linfocitos y a las células epiteliales, consiguen aislarlo, conformando el granuloma tuberculoso (10). El hallazgo de necrosis caseosa en el interior de estos granulomas es muy sugestivo de tuberculosis y permite diagnosticarla anatomopatológicamente.

Este desarrollo es el que ocurre en la mayoría de casos, consiguiendo contener la infección y dejando como señal de paso una cicatriz fibrosa que suele calcificar, lo que nos permite ponerla en evidencia mediante técnicas radiológicas. Pero el curso de la infección puede continuar e invadir el torrente sanguíneo, especialmente en individuos inmunocomprometidos, y afectar a otras localizaciones como los riñones, la columna vertebral o el sistema nervioso central (9). Ésto supone una situación más grave (tuberculosis diseminada) que requiere una actuación urgente. El riesgo de progresión de la enfermedad es mayor dentro de los 2 primeros años post-exposición y lo más común es que aparezca dentro de los 5 primeros años que siguen a la primoinfección. De todas formas, como ya hemos expuesto, la enfermedad puede entrar en fase latente y desarrollarse en cualquier periodo posterior de la vida del sujeto.

La capacidad de la respuesta celular de generar memoria inmunológica se puede poner de manifiesto mediante la prueba de la tuberculina (técnica de Mantoux). En función de la respuesta a la prueba, podemos a los pacientes en 3 categorías:

- Pacientes expuestos que no han desarrollado la infección: la inmunidad innata ha acabado con todo rastro de los bacilos antes de que la inmunidad celular haya sido capaz de lanzar una respuesta (tuberculina negativos).
- Pacientes infectados sin signos de enfermedad: el paciente ha generado una respuesta celular frente a *M. tuberculosis* que le ha permitido obtener memoria inmunológica, por lo tanto, reacciona al test de la tuberculina. La primoinfección ha sido resuelta, pero puede que tenga lesiones con bacilos viables que estén en fase latente.
- Pacientes infectados con enfermedad activa: pacientes tuberculina positivos, con marcadores clinicoradiológicos acompañados de signos y síntomas que nos permiten sospechar una infección activa. Necesitaríamos una confirmación micobacteriológica.

En los últimos años la prueba de la tuberculina está siendo sustituida por la detección *in vitro* del *Interferon-gamma release assay* (técnicas IGRA, en sus siglas en inglés) que, a diferencia de la primera, se trata de una prueba objetiva (ELISA) que se puede cuantificar y se lleva a cabo en el laboratorio de Microbiología (ver más adelante)

Infección latente	Tuberculosis activa
No sintomático	Presenta síntomas que pueden incluir: <ul style="list-style-type: none"> • tos intensa que dura 3 semanas o más • dolor en el pecho • tos con sangre o esputo • debilidad o fatiga • pérdida de peso • falta de apetito • escalofríos • fiebre • sudores nocturnos
Buen estado general	Mal estado general
No pueden transmitir la enfermedad	Bacilíferos
Mantoux / IGRAs +	Mantoux / IGRAs +
Radiografía de Tórax normal y frotis de esputo -	Puede tener Radiografía de Tórax alterada o frotis de esputo + o un cultivo de esputo +
Tratar la enfermedad latente	Tratar la enfermedad

Figura 4. Diferencias entre infección latente y activa (11).

2.3 Tratamiento

La tuberculosis es una de las pocas pandemias que existen que tenga un tratamiento tan claramente establecido y, por tanto, tiene cura. La terapia estándar de **primera línea** consiste en la administración de cuatro fármacos: dos pautados durante seis meses, isoniazida y rifampicina, a los que se asocian etambutol y pirazinamida durante los dos primeros meses (2). Se estima que gracias al diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad se han salvado cerca de 49 millones de personas entre el año 2000 y 2015 (7).

La razón por la que se usan cuatro fármacos diferentes para tratar la infección por *M. tuberculosis* es debido a su capacidad de sufrir mutaciones espontáneas en las dianas genéticas de los fármacos, lo cual se ponía de manifiesto en los orígenes del tratamiento como una recaída precoz tras una rápida mejoría, cuando sólo se estaba tratando con un solo fármaco. La idea que está detrás de asociar al menos tres fármacos es la de asegurarnos de que para que se dé una mutación simultánea sobre los genes que regulan las dianas de todos los fármacos en una misma micobacteria sea necesario alcanzar una población hipotética de 10^{15} a 10^{18} bacterias/ml, lo cual es imposible (2).

Una vez más, la diferencia de recursos afecta a la forma en que los enfermos reciben su tratamiento. Así, en el caso de países de bajos ingresos el problema no es tanto la accesibilidad al mismo sino la falta de personal entrenado que informe y realice un seguimiento a los pacientes, por lo que el cumplimiento terapéutico en zonas deprimidas es muy deficiente y es susceptible de provocar un problema aun mayor al generar resistencias.

También existe toda una serie de fármacos de **segunda línea** a los que se recurre cuando la sensibilidad a los de primera línea es inferior a la deseada. Entre ellos se encuentran: amikacina, tobramicina, capreomicina, etionamida, cicloserina, oxoflacin, levofloxacin, clofazolina o linezolid.

2.4 Resistencias

Un importante aspecto de *M. tuberculosis* es su capacidad para generar resistencias al tratamiento mediante mutaciones cromosómicas permanentes.

Existen 2 tipos de resistencias:

- **Primaria:** Mutantes naturales, por mutaciones cromosómicas naturales e irreversibles, que surgen espontáneamente en bacilos nunca expuestos a fármacos.
- **Adquirida:** Es una selección de mutantes por tratamientos incorrectos. Cuando se indica un tratamiento con un solo fármaco o asociaciones de dos fármacos a un paciente que tiene resistencia a uno de ellos, se seleccionan los bacilos resistentes por mutación espontánea y pasan a constituir una nueva población bacilar, ahora resistente a los dos fármacos administrados. Este tipo de resistencia es cromosómico, definitivo e irreversible, por tanto, cualquier fármaco que se haya administrado incorrectamente queda invalidado para siempre. Para evitarlo es necesario asegurarse siempre de usar de una correcta asociación de fármacos que no se hayan empleado anteriormente o que, si se utilizaron, lo hayan sido en asociaciones correctas.

En este contexto podemos encontrar con dos tipos de paciente: uno que presenta resistencia sin haber tenido tratamiento previo, y otro en el que se observan resistencias tras haber sido tratados con fármacos antituberculosos en un primer momento. La orientación diagnóstica y terapéutica debe ser detectar lo más precozmente posible las resistencias, naturales o espontáneas, que pueda presentar *M. tuberculosis* y tratar siempre con una pauta en la que se asocien correctamente varios medicamentos, ajustada a los resultados que obtengamos de las pruebas de sensibilidad a fármacos, y hacer hincapié en el cumplimiento terapéutico.

En función del número de fármacos a los que afecte la resistencia la podemos clasificar en (2):

- Monorresistencia: los fármacos más afectados normalmente son isoniazida y estreptomina.
- Polirresistencia: afecta a 2 o más fármacos de manera simultánea, pero nunca a isoniazida y rifampicina a la vez.
- Multirresistencia (MDR): afecta simultáneamente a isoniazida y rifampicina, con o sin otras asociaciones.
- Resistencia extrema (XDR): afecta a isoniazida y rifampicina y, a mayores, afecta a un fármaco inyectable y a las fluoroquinolonas.

Se calcula que en torno al 10% de las infecciones por *M. tuberculosis* son resistentes a tratamiento, pero su distribución nos es homogénea a nivel mundial, ya que éstas se concentran en las zonas más empobrecidas del globo. Este hecho hace que el problema tome mayores dimensiones ya que estas áreas son un caldo de cultivo para posibles nuevas resistencias, suponiendo una posible amenaza si se consigue asentar una cepa que sea resistente a todos los fármacos disponibles.

3 Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis

3.1 Muestras

La calidad en la recogida y tratamiento de las muestras es capital de cara a garantizar el mayor éxito diagnóstico, ya que la sensibilidad de las pruebas más precoces, como la microscopía óptica, varía de una manera notable.

Para que una muestra pueda ser considerada como óptima debe ser introducida en recipientes estériles sin ningún tipo de aditivo añadido, en un volumen suficiente (5-10ml) (2). Como regla general, las muestras deben de llegar en menos de 24 horas al centro diagnóstico de referencia, y en caso de ser necesario transportarlas durante más de una hora es conveniente mantenerlas a una temperatura de 4°C (3). Pero esto no se puede aplicar por igual a todos los laboratorios ya que las características de sus áreas demográficas pueden ser muy distintas. En zonas que no son de primer nivel asistencial, las muestras tardan más en llegar de los puntos de recogida a los centros de referencia y las condiciones en las que llegan son muy diferentes de una región a otra.

3.1.1 Muestras respiratorias

La muestra de referencia es el esputo. Un volumen de 3-10 ml suele ser suficiente. Es muy importante instruir al paciente a la hora de la toma de la muestra para conseguir

secreciones profundas que contengan poca saliva y con abundantes neutrófilos. La calidad de estas muestras influye en el rendimiento de las pruebas a las que van a ser sometidas. En aquellos pacientes que no son capaces de expectorar correctamente, como los niños menores de 12 años, está indicado realizar un esputo inducido o un aspirado gástrico. Hay que señalar que el pH ácido puede dañar a las micobacterias, por lo que es necesario neutralizarlo o procesar la muestra rápidamente. Una recogida con broncoscopio queda reservada para aquellas situaciones en las que las anteriores pruebas no pueden ser realizadas o se quiere descartar a la vez otra posible causa infecciosa (2).

3.1.2 Muestras extrarrespiratorias

En nuestro medio la frecuencia de las formas extrapulmonares oscila entre un 15 y un 20% (2), siendo la ganglionar y la pleurítica las principales localizaciones. Hay que señalar que la presencia histológica de un granuloma con necrosis caseosa (11), tal y como hemos señalado previamente, es diagnóstico de tuberculosis e implica un comienzo del tratamiento.

En la ganglionar la técnica de referencia es una punción-aspiración con aguja fina, si las lesiones son lo suficientemente superficiales. En caso de no ser así, se recurre a la biopsia. En las formas pleuríticas la prueba más frecuente es el análisis del líquido obtenido tras una toracocentesis diagnóstica a pesar de que la prueba con mayor rentabilidad sea la biopsia. En un 10% de los casos se da una tuberculosis ósea, de las que la mitad afectan al esqueleto axial. En estas formas el dolor es el síntoma guía y la clínica es larvada y su abordaje precoz está estrechamente relacionado con el pronóstico. El problema de ellas es el difícil abordaje de los focos de infección, necesitando recurrir a punciones guiadas por TAC o drenajes quirúrgicos para obtener las muestras necesarias.

Existen formas de serositis en las que alcanzar un volumen de muestra adecuado para realizar todas las pruebas pertinentes resulta muy difícil. En estos casos la microscopia óptica proporciona un escaso rendimiento, y se da preferencia al resto de pruebas. Especialmente se da en los casos de artritis tuberculosa o meningitis, en los que se intenta que la muestra tenga un volumen mínimo de 1 ml (2). En cuanto al hemocultivo tan solo decir que resulta poco rentable ya que las bacteriemias por *M. tuberculosis* no son frecuentes en sujetos inmunocompetentes y, además, no se puede utilizar las tinciones porque los colorantes interfieren con los hematíes y hacen que sea imposible valorar la muestra.

3.2 Métodos diagnósticos

3.2.1 Microscopía

El análisis al microscopio de una muestra de esputo extendida sobre un porta con la ayuda de tinciones ha sido, y es, la primera línea diagnóstica durante más de 100 años. Su fácil implantación y los bajos requerimientos técnicos hacen que sea una prueba muy accesible, especialmente en los países de bajo desarrollo. Las micobacterias se caracterizan por el alto contenido lipídico de su pared celular, en la que se incluye una capa especial de ácidos micólicos, que las confiere una resistencia a la tinción con los colorantes habituales (anilina) por lo que para visualizarlas es necesario recurrir a colorantes especiales (arilmetanos) que dejan a las bacterias teñidas incluso después de

decolorarlas con mezclas de alcohol y ácido sulfúrico o clorhídrico (8). De ahí que se las denominen bacterias ácido-alcohol resistente (BAAR).

La tinción que clásicamente se ha utilizado para la visualización de estos BAAR y, por tanto, de *M. tuberculosis*, es la de Ziehl-Neelsen, que tiñe de forma homogénea a todas las bacterias de color azul salvo a las micobacterias, que retienen el color rojo a pesar del lavado con alcohol y ácido, destacando de esta manera su presencia (figura 5). El problema con esta tinción es que su sensibilidad es muy baja, en un rango del 20 % al 80% (10) y su utilidad en pacientes con poca carga de bacilos en el esputo, como los niños y los pacientes coinfectados con VIH, hacen que sea una técnica con limitaciones.

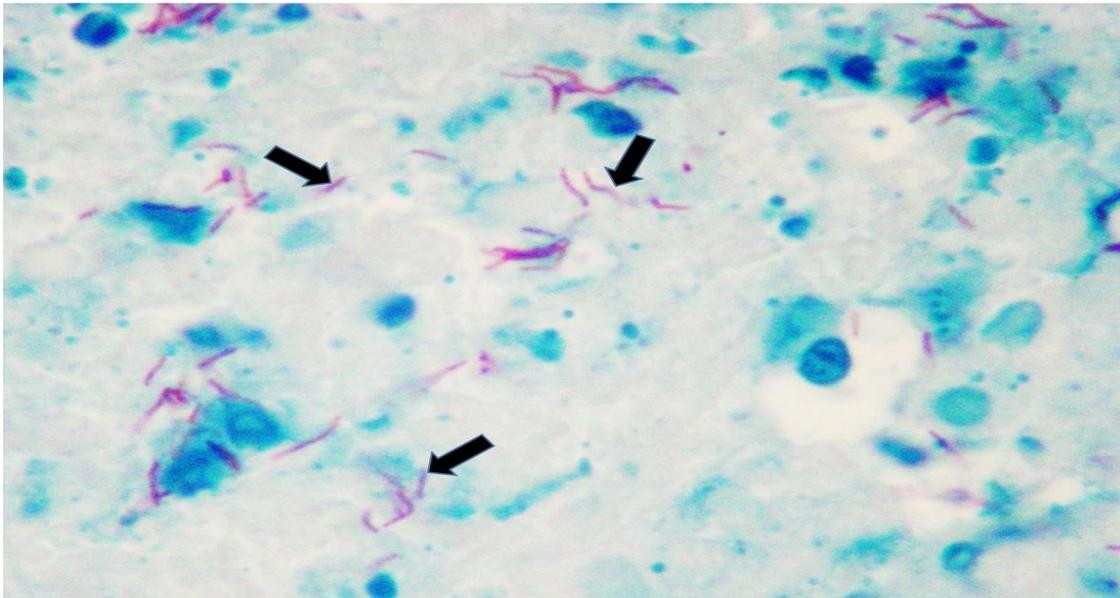


Figura 5. Tinción de Ziehl Neelsen positiva para micobacterias (flechas negras).

Por otra parte, en las zonas más desarrolladas se aplican de forma sistematizada las tinciones fluorescentes, siendo la más utilizada la tinción de auramina-rodamina, que consigue que las micobacterias sean luminosas sobre un fondo oscuro y aumenta la sensibilidad de la prueba un 10% con respecto a las técnicas más tradicionales (2). El inconveniente de estas técnicas fluorescentes es el coste del equipamiento necesario, el entrenamiento del personal que lo maneja y el mantenimiento de las lámparas de radiación UV. La solución a esta serie de problemas son los microscopios LED que abaratan mucho el proceso y su mantenimiento, y tienen la capacidad de emitir en longitud de onda normal o fluorescente. Por esta razón se está impulsando la sustitución de los microscopios tradicionales por LED en todos los laboratorios, ya que, al necesitar menos magnificación, agiliza la evaluación de las muestras para confirmar o descartar la presencia de micobacterias en una tinción fluorescente y, además, la sensibilidad es mayor (10). Gracias a ello se puede testar una prueba en 2 minutos frente a los 22 que se necesitan de media en una tinción clásica (3).

A pesar de que se trate de una técnica barata y rápida, el principal problema que encontramos con la microscopía es su baja sensibilidad, necesitando una alta carga bacteriana en la muestra, del orden de 5.000-10.000 bacterias/ml, para resultar positiva (2). Con el fin de solventar estas limitaciones, se han recurrido a varios procedimientos,

como la concentración del esputo mediante la centrifugación o la sedimentación, que permiten elevar la sensibilidad hasta un 26% y un 11% en enfermos VIH positivos (10). De todas formas, sigue siendo una técnica incapaz de descartar *a priori* una tuberculosis (escaso valor predictivo negativo), siendo bajísima su sensibilidad, menor del 15%, en muestras extrapulmonares. Por ello se requieren otros procedimientos más sensibles que refuercen la inexistencia de la infección activa.

En nuestro medio, la sensibilidad oscila en torno al 55-65% (2), pero en zonas con prevalencias muy altas la sensibilidad es mayor. Esta idea refuerza la rentabilidad que se puede sacar a las pruebas de microscopia en las zonas más deprimidas del globo y generalmente es la única arma diagnóstica de la que disponen muchos centros. La especificidad de la tinción es bastante alta, aunque otro tipo de bacterias, como *Nocardia* o *Rhodococcus*, pueden dar también positiva la prueba.

En los países occidentales se hace un análisis de esputos seriados, recogiendo tres esputos matutinos para confirmar la presencia de *M. tuberculosis*. También se aplica para confirmar que un paciente, tras recibir tratamiento, no es bacilífero y se pueden retirar las medidas de aislamiento. En cambio, en los países en vías de desarrollo, el volumen de pacientes y la falta de instalaciones adecuadas, recursos y personal entrenado hacen que se sobrecarguen los laboratorios, retrasando el diagnóstico y el tratamiento, cuando es esencial instaurarlo precozmente. Por otro lado, el esfuerzo que supone ir al médico para muchos de los pacientes sería muy difícil de asumir si tuvieran que acudir tantas veces a la consulta, haciendo que el cumplimiento terapéutico y el seguimiento sea muy difícil. Por ello la OMS recomienda hacer dos esputos en un mismo día, justificado por el hecho de que tan solo un 3.1% de los casos diagnosticados en zonas deprimidas fue gracias al tercer esputo (10).

Está también indicado que, al menos, uno de los esputos sea vespertino, ya que se consideran que son de mayor calidad debido a que el aclaramiento mucociliar es menor y las secreciones respiratorias están más concentradas. Con esta medida se pretende agilizar el diagnóstico precoz de la tuberculosis para asegurarse de que los pacientes abandonen el centro con el tratamiento. El conflicto puede darse, como ya hemos mencionado, en los pacientes VIH positivos, ya que la sensibilidad de la microscopía del esputo es reducida. Por ello se recomienda el cultivo en medios líquidos de los esputos negativos, especialmente en pacientes infectados con el virus y con alta sospecha de tener tuberculosis.

3.2.2 Cultivo

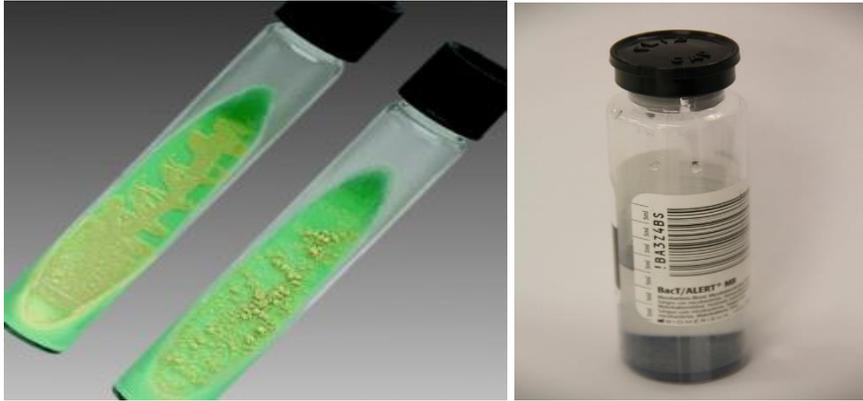
Hoy por hoy, el cultivo del *M. tuberculosis* sigue siendo el *gold standar* que rige el diagnóstico clínico de la enfermedad. Pese a todos los avances realizados, todavía no existe una prueba que haya desbancado al cultivo como método de referencia. Se ha fijado el límite de la sensibilidad de esta prueba entre 10^1 - 10^2 microorganismos/ml (3). Obtendremos un resultado positivo en un 85-90% de los casos de tuberculosis respiratorias, mientras que en la tuberculosis extrapulmonar la sensibilidad disminuye al 50%, salvo en el caso de la tuberculosis ganglionar (2). El cultivo es especialmente relevante como ya hemos señalado en pacientes VIH positivos, ya que es el método más fiable del que disponemos para descartar una posible tuberculosis.

Previamente al cultivo, las muestras que no provengan de cavidades estériles necesitan ser tratadas para evitar contaminaciones debidas a la flora bacteriana, y también para obtener el máximo rendimiento de ellas. No podríamos sembrar una muestra si no aplicáramos estas medidas ya que con toda probabilidad el sobrecrecimiento de la flora comensal alterarían nuestras pruebas diagnósticas. Hay que tener en cuenta que para manipular las muestras es necesario disponer de medidas de protección biológicas, tales como campanas de bioseguridad con presión negativa o equipos de barrera, ya que se producen aerosoles durante el proceso que pueden infectar al operador (figura 6). Normalmente el esputo se somete a una digestión, homogenización, descontaminación y concentración antes de ser sembrado. El método más extensamente utilizado para descontaminar las muestras es el uso de N-acetil-L-cisteína (NALC)-NaOH durante 20', que nos permite barrer toda la flora potencialmente contaminante dañando lo menos posible a las micobacterias presentes, de tal manera que alrededor de un 33% mueren (10), dejando un número suficiente para que puedan ser estudiadas. Uno de los problemas derivados del uso de este álcali es la elevación del pH, que ha de ser neutralizado para que las pruebas posteriores no sean alteradas.



Figura 6. Cabina de seguridad

El primer medio sólido específico para cultivo del *M. tuberculosis* fue el Lowenstein-Jensen (LJ), hecho a base de huevo (figura 7). Tiene incorporado verde de malaquita para evitar el sobrecrecimiento de bacterias contaminantes y se debe inocular al menos un cultivo sólido en LJ ya que hay ramas del *M. tuberculosis complex* que crecen mejor en él. Es el medio más rudimentario que disponemos, lo que le convierte en el más sencillo de manejar en laboratorios de limitadas prestaciones. Su preparación es sencilla, puede estar varios meses refrigerado y aun así ser capaz de soportar una colonia de *M. tuberculosis* y tiene una buena capacidad de buffer para evitar que se alcalinice mucho el medio. Posteriormente se han desarrollado también medios líquidos, entre los que se encuentra el Middlebrook 7H9 (figura 8).



Figuras 7 y 8. Medio de cultivo sólido tipo Lowenstein-Jensen y medio de cultivo líquido tipo Middlebrook.

Hasta hace 25 años el uso de medios líquidos no estaba extendido debido a que *M. tuberculosis* no enturbia el medio, lo que hace no se sea valorable macroscópicamente. Hoy en día, en cambio, se han desarrollado varios modelos comerciales automatizados que permiten monitorizar el crecimiento de los cultivos de una forma continua y nos permiten agilizar el diagnóstico al detectar precozmente la presencia de colonias del bacilo. El primero de ellos fue el BACTEC 460TB, un sistema semiautomático que se basa en la incorporación del ácido palmítico marcado con C^{14} y que monitoriza la cantidad de $^{14}CO_2$ que hay en el tubo (10), siendo directamente proporcional al nivel de crecimiento de las colonias de *M. tuberculosis*.



Figura 9. Sistema BACTEC460 TB.

El inconveniente de esta técnica es la necesidad de utilizar laboratorios de contención radioactiva para llevarla a cabo, por lo que se han desarrollado otras líneas de trabajo que permitan sortear este problema. Para ello ahora disponemos de sistemas totalmente automatizados que se basan en la fluorescencia para monitorizar el crecimiento bacteriano. Estos medios incorporan un marcador de fluorescencia que se altera ante cambios en la presión parcial de oxígeno o en la concentración de CO_2 . Estos medios se introducen en una incubadora a 35-37° C y son barridos periódicamente por un láser que constata si los sensores han detectado crecimiento o no, confirmando los casos positivos y ratificando los casos en los que se haya completado el tiempo de incubación, de 42 días, y no se haya detectado crecimiento (2). Los tres principales

sistemas comercializados son: BACTEC MGIT 960, MB BacT y VersaTREK (figuras 10 y 11).



Figura 10. Sistema BacT.



Figura 11. Sistema MGIT 960

A modo de conclusión, se ha comprobado que la sensibilidad de los medios líquidos es ligeramente mayor a la de los sólidos, especialmente en el aislamiento de micobacterias no tuberculosas. Pero a pesar de que permiten agilizar el diagnóstico, el principal inconveniente en cuanto a los cultivos en general es el tiempo necesario para obtener un resultado, ya que puede llevar semanas. Una muestra con una tinción positiva tarda en crecer en torno a 3-12 días y una cuya tinción ha sido negativa suele necesitar 15-30 días (2). Esto supone un retraso en la instauración del tratamiento y hay que resaltar que necesitamos identificar la especie de micobacteria que ha crecido en el cultivo, por lo que se necesitan aún más pruebas para terminar de completar el diagnóstico.

3.3 Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

Tras observar el crecimiento de colonias en los medios de cultivos y de constatar que no ha habido una contaminación, es necesario comprobar qué tipo de micobacteria ha crecido y clasificarla como tuberculosa o no tuberculosa, hecho que condiciona radicalmente el tratamiento.

3.3.1 Métodos no moleculares

Con dicho fin, tradicionalmente se practicaban una batería de pruebas bioquímicas y fenotípicas para poner el nombre adecuado a la bacteria objeto de estudio. Se medía, entre otras variables, la velocidad de crecimiento, la fotorreactividad de las colonias, su morfología y pigmentación y también se usaban test como el de la acumulación de niacina, la reducción a nitratos, la prueba de la catalasa, la captación de hierro, la detección de actividad ureasa, el test de la piramizinasas y muchas otras (8).

M. tuberculosis se caracteriza por ser una bacteria no cromógena y de crecimiento lento (tarda más de 5-7 días en formar colonias). Estos métodos clásicos de identificación, ante el auge de las técnicas moleculares, han quedado desbancados debido a lo arduo que resultan, la lentitud con la que se obtienen los resultados y el potencial peligro de

contagio al que se expone el trabajador ya que tiene que manipular inóculos de bacterias vivas para poder realizarlos.

También se han desarrollado técnicas de inmunocromatografía para la detección de antígenos específicos, que se puedan usar de manera rápida y sencilla. Los primeros test disponibles para determinados antígenos como el lipoarabinomano o el MPT32 y el MPT51 (12) no han arrojado datos significativos que permitan reforzar su implantación. El test que sí parece resultar relevante es el *lateral flow assay* con la aglutinación de MPTC64 (13). No necesitamos infraestructura adicional al kit de detección y en 15 minutos nos puede dar los resultados. Necesita una cantidad mínima de 10^5 bacterias/ml y es capaz de detectar al MBTC en más del 95% de los cultivos positivos (2).

La técnica consiste en extender sobre una lámina de nitrocelulosa un anticuerpo monoclonal anti-MPT64, sobre el que se vuelca la muestra y otro anticuerpo anti-MPT64 conjugado con partículas coloidales de oro, conformándose un estudio tipo sándwich que revele la presencia del MTBC (10). Por desgracia, al tener que manipular unas cantidades de inóculo vivo considerable, se necesitan medidas especiales de seguridad que permitan trabajar al operador con total tranquilidad. Se le ha atribuido una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96.4% (13) aunque también se han descrito casos de falsos negativos por mutaciones en el gen *mpb64*, por lo que resulta conveniente validar los resultados.

3.3.2 Métodos moleculares

La gran revolución diagnóstica ha acontecido con la irrupción de las técnicas moleculares, convirtiéndose en uno de los campos que ha acaparado la investigación durante bastante tiempo. El objetivo es filiar correctamente al microorganismo a partir de una cantidad mínima de ADN/ARN de una manera rápida y lo más sencilla posible. Gracias a ellas se espera reducir la demora diagnóstica, incrementar la precisión al identificar el agente etiológico y detectar las posibles resistencias presentes de una manera más precoz.

El problema es que para ello se necesita un personal con un cierto nivel de formación y unas instalaciones que permitan realizar las extracciones de material genético sin posibles contaminaciones y el aparataje pertinente que permita procesarlas. En este ámbito se han perfilado dos conjuntos de técnicas diferentes, las de identificación mediante la hibridación con sondas de ácidos nucleicos y las de amplificación de material genético.

3.3.2.1 Técnicas de hibridación

En lo referente a las sondas, las primeras disponibles fueron las que utilizan ADN complementario al ARN ribosómico de la micobacteria (AccuProbe®, Hologic, USA). Las muestras se recogen directamente del medio de cultivo, tras lo cual se lisan y se les añade las sondas para que hibriden formando un complejo ADN-ARN estable (14). Gracias al marcador de quimioluminiscencia, se puede identificar *M. tuberculosis* y diferenciarlo del complejo *M. avium-intracellulare*, del *M. kansasii* y del *M. goodii* tras pasar un lector de luminiscencia por la muestra. La especificidad y la sensibilidad de esta técnica es buena, pero el reducido número de especies que permite discriminar hace que sea limitada (15).

Otra técnica de la que disponemos es la diseñada con sondas fluorescentes de ácidos nucleicos peptídicos, que tienen como diana el 16S rRNA de *M. tuberculosis*, utilizando un panel que permite discernir entre más de 25 especies de bacterias diferentes. Los resultados se obtienen tras aplicar una técnica de fluorescencia con hibridación *in situ* (FISH) que lleva en torno a 3 horas y que cuyos resultados han mostrado una sensibilidad y una especificidad cercana al 100% (16). Los requerimientos de esta técnica son complejos, y a pesar de su menor susceptibilidad a la contaminación con respecto a las técnicas de amplificación molecular, no ha tenido repercusión en los laboratorios clínicos (16).

3.3.2.2 Técnicas de amplificación genética

Tras la aparición de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el año 1983, se abrió un gran campo de investigación del que se obtuvieron, a partir de la década de los 90, un conjunto de técnicas innovadoras que ofrecían una aproximación totalmente diferente al diagnóstico de la tuberculosis. En la actualidad ocupan un campo muy relevante del diagnóstico e identificación de *M. tuberculosis* y merecen una aproximación un poco más detallada.

Con la técnica de la PCR es posible obtener millones de copias de un fragmento del ADN. Con la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis* se ha conseguido descifrar sus 4,4 millones de bases, que contienen 4.000 genes que codifican proteínas y 50 que codifican RNA (8). Con el estudio de las mismas se han conseguido determinar regiones estables de ADN para asignar el género *Mycobacterium* y otras regiones con mayor hipervariabilidad que nos permiten utilizarlas como marcadores de especie. Por tanto, si al analizar una muestra de ADN problema conseguimos determinar alguno de estos marcadores, conseguiremos filiar la micobacteria de manera correcta.

Se han estudiado numerosas dianas de amplificación o marcadores, los cuales enumeramos a continuación (15):

- IS6110
- 16S rDNA
- Gen *hsp65*
- Gen *rpoB*
- Gen *recA*
- Gen *dnaj*
- Gen *sodA*
- Región intergénica 16S-23

De las citadas dianas las cuatro primeras son las más relevantes, especialmente la IS6110 que fue una de las primeras dianas en ser comparadas con cultivo para demostrar su utilidad como prueba diagnóstica. Se consiguió determinar una sensibilidad del 83.5% y una especificidad del 99.0% pero se encontraron problemas que pueden afectar de una forma muy importante a este tipo de pruebas, como la presencia de ADN contaminante, amplificación no específica de la muestra o la presencia de inhibidores que neutralizan a las polimerasas e invalidan el resultado de las pruebas.

Con excepción de la PCR en tiempo real (ver más adelante), las técnicas de amplificación no suelen estar estandarizadas, y cada laboratorio utiliza una diana de amplificación y unos reactivos propios para amplificar las muestras que manejan. Una alternativa a estos métodos caseros ha sido el desarrollo de técnicas comerciales, automatizadas o semiautomatizadas, que ofrecen unos resultados más homogéneos y sencillos de comparar ya que los resultados deberían ser idénticos independientemente del laboratorio que las aplique (siempre y cuando se utilicen de manera adecuada y se eviten contaminaciones que adulteren los resultados).

Todas estas técnicas se basan en una amplificación genómica y un posterior análisis del fragmento amplificado o amplicón mediante su observación directa, bien mediante una electroforesis en geles de agarosa, o mediante una hibridación, restricción o secuenciación del amplicón, que permita demostrar la existencia del DNA de interés en la muestra. El objetivo es agilizar el diagnóstico para poder empezar el tratamiento en una etapa más temprana, mejorar el pronóstico de los pacientes y realizar una intervención epidemiológica precoz, aislando a los pacientes que sea necesario y facilitando el estudio de los contactos. Con estas técnicas podemos detectar a *M. tuberculosis* en un plazo de 12-24 horas (3).

En el último eslabón en esta cadena se encuentra la PCR en tiempo real, que consiste en la amplificación y detección de las regiones amplificadas de manera simultánea. Para ello se utilizan sondas marcadas con fluorocromos que hibridan con las zonas de interés. De esta manera, al ir ampliándose el fragmento seleccionado, se va aumentando la concentración de fluorocromos y la emisión de fluorescencia, la cual se puede monitorizar y cuantificar. Entre las sondas que disponemos ahora se encuentran las TaqMan, Beacon y FRET que permiten dar un resultado en 3 horas (18). Esta técnica es bastante más sencilla que las anteriores, debido a su automatización, y bastante más fiable ya que al no manipular el material amplificado se evitan posibles contaminaciones. Se han hecho numerosos estudios para comprobar la sensibilidad y la especificidad de esta técnica, entre los cuales citamos al de Burggraf et al. (2005) (17) que, comparando los resultados con un control interno, estudió un gran número de muestras clínicas y confirmó que la prueba tenía un 100% de sensibilidad y un 98.6% de especificidad.

A pesar de lo prometedor de la PCR en tiempo real, tras su lanzamiento y el gran número de trabajos publicados sobre ella, no se ha conseguido demostrar una evidencia científica sólida y concluyente que avale el uso generalizado de estas pruebas (19). Por lo tanto, a día de hoy el cultivo sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de la tuberculosis, y pese a la inferior sensibilidad de la microscopia, ésta siempre ha de realizarse si está disponible, ya que el uso de técnicas moleculares no justifica su suplantación (ver más adelante). De todas formas, se ha constatado que estos métodos tienen un valor predictivo positivo mayor que la microscopia (>95%) en las muestras con baciloscopia positiva, en áreas con niveles altos de prevalencia y alta tasa de aislamientos de micobacterias no tuberculosas. En cambio, en aquellas pruebas con baciloscopia negativa y cultivo positivo, las técnicas de amplificación molecular consiguen detectar a *M. tuberculosis* entre un 50-80% de las veces (19) (figura 12).

Microscopia	Técnicas de amplificación molecular	Interpretación
Positivo (+)	Positivo (+)	Está justificado la terapia con antituberculosos. El diagnóstico se valida con el cultivo.
Negativo (-)	Positivo (+)	Comenzar terapia según juicio diagnóstico a la espera del cultivo. Considerar pruebas complementarias y repetir sobre una nueva muestra la técnica de amplificación. La probabilidad de padecer tuberculosis es muy alta si dos muestras o más son positivas.
Positivo (+)	Negativo (-)	Demostrar la presencia de inhibidores de la amplificación (un 3-7% de las muestras de esputo los contienen). De ser así, el resultado sería un falso negativo y las pruebas de amplificación quedarían invalidadas para esta muestra. Comenzar terapia según juicio diagnóstico a la espera del cultivo. Considerar realizar pruebas complementarias.
		Si no se detectan inhibidores, comenzar terapia según juicio diagnóstico a la espera del cultivo. Considerar realizar pruebas complementarias. Se puede asumir que un paciente tiene una micobacteria no tuberculosa si al analizar una segunda muestra la baciloscopia sigue siendo positiva y las técnicas de amplificación negativas.
Negativo (-)	Negativo (-)	Comenzar terapia según juicio diagnóstico a la espera cultivo. Considerar realizar pruebas complementarias. Las pruebas de amplificación molecular no tienen una sensibilidad suficiente para descartar una tuberculosis en pacientes sospechosos de padecerla.

Figura 12. Interpretación de los resultados de las técnicas de amplificación molecular (18).

Por lo tanto, la utilidad de estas pruebas sobre muestras respiratorias es importante, pero siempre han de estar respaldadas con un cultivo. Según los últimos metaanálisis publicados, tomando como referencia siempre el cultivo, la sensibilidad y la especificidad de las técnicas de amplificación molecular en muestras con baciloscopia positiva fue de un 96% y un 85% respectivamente. En cambio, en aquellas muestras que

la baciloscopia resultó negativa, la sensibilidad fue de un 66% y la especificidad de un 98% (20). La aplicación de estas técnicas en los laboratorios clínicos ha sido objeto de debate debido a la falta de evidencia científica homogénea. Por ello, se recomienda utilizar tan solo las técnicas aprobadas por organizaciones oficiales como la *Food and Drug administration* (FDA) o la Unión Europea (EU). Se recomienda aplicar estas pruebas diagnósticas siguiendo las guías clínicas redactadas por organismos como el *Center of Diseases Control* (CDC), que definen el tipo de paciente susceptible de beneficiarse de las mismas y en qué tipo de muestras se puede conseguir una mayor rentabilidad diagnóstica. Se recomienda utilizarlas en todo paciente con signos y síntomas de padecer tuberculosis pulmonar, en el que no se haya podido llegar a un diagnóstico y en que el resultado de esta técnica puede condicionar el tratamiento y demás medidas necesarias para el control de la enfermedad. No se recomienda utilizarlas de manera sistemática ya que el valor predictivo positivo de la prueba cuando hay baja sospecha de tuberculosis pulmonar es menor del 50% (19). En cuanto a la aplicación de las técnicas moleculares sobre muestras extrapulmonares (líquidos orgánicos, material óseo, biopsias ...) no existe ningún tipo de consenso y se utiliza de manera ocasional según los distintos centros, ya que la mayoría de las técnicas comerciales están homologadas para su aplicación en muestra respiratoria.

Técnica	Diana de amplificación	Método de detección	Sensibilidad en muestras respiratorias (%)	Sensibilidad en muestras extra respiratorias (%)	Especificidad global (%)
AMTD2	16S rARN	Quimioluminiscencia	80-100	60-90	95-100
LCx	Proteína antigénica b	Fluorométrica	80-90	65-80	90-100
AMPLICOR	16S rARN	Colorimétrica	75-100	45-60	90-100
BD Probe Tec	IS6110 y 16S rARN	Fluorométrica	55-100	30-80	45-100
INNO-LIPA v2	IR16S-23S	Colorimétrica	50-95	60-80	90-100
GenoType Direct	23S rARN	Colorimétrica	60-95	60-80	95-100
RT-PCR	16S rARN	Fluorométrica	70-90	65-85	85

Figura 13. Principales técnicas de amplificación comercializadas (15)

En la figura 13 se muestra un listado de las principales técnicas de amplificación y se puede ver cómo ninguna técnica ofrece una sensibilidad suficiente para aplicarlas de forma sistemática en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar.

Quedaría, por último, analizar el coste-beneficio de estas pruebas. Aunque ya hemos mencionado el importante valor predictivo de estas técnicas, sobre todo en áreas con una alta incidencia de micobacterias no tuberculosas, su aplicación está muy limitada por el coste que supone su implantación en países poco desarrollados. Se necesitan infraestructuras específicas y recursos económicos suficientes para sobrellevar los costes de las pruebas. Sin embargo, en zonas más desarrolladas el impacto económico que conllevan estas técnicas difiere, ya que a pesar de ser más costosas que otras técnicas, el coste global disminuye al ahorrar en otras actuaciones, como aislamientos innecesarios, o búsqueda de contactos al interrumpir la cadena de transmisión más rápidamente. De igual manera, la detección precoz de *M. tuberculosis* nos permite evitar usar tratamientos empíricos innecesarios, con lo que se evita la aparición de resistencias.

El objetivo de las técnicas moleculares es el de demostrar la existencia de *M. tuberculosis*, ya sea en el cultivo o, lo que es más importante, en la propia muestra clínica. A partir de un inóculo del cultivo podemos aplicar una batería de pruebas moleculares para esclarecer la especie concreta que tenemos entre manos. Para ello podemos recurrir a las sondas de ADN (sistema AccuProbe), o podemos utilizar directamente técnicas de amplificación genética, ya sean específicas, o por PCR seguida de la secuenciación de los amplicones obtenidos. Las secuencias obtenidas se comparan con bases de datos disponibles en la red que recopilan toda la información genética disponible de cada especie de micobacteria. Algunas de estas bases de datos son el GenBank (GenBank), la Ribosomal Differentiation of Medical Microsystems (RIDOM) y la European Molecular Biology Laboratory (EMBL). La diana de amplificación más frecuente usada en estos casos es el gen que codifica el 16S rRNA, ya que este gen contiene regiones constantes y otras hipervariables que nos permiten diferenciar entre una especie y otra (17).

Otras técnicas de identificación aprobadas (figura 13) son: el InnoLiPa Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Belgium) que utiliza como diana de amplificación el espacio intergénico 16S-23S y que es capaz de discriminar entre 17 especies de micobacterias aisladas en las muestras clínicas (17), y el GenoType (Hain Lifescience, Nehren, Germany), que ha desarrollado 3 kits diferentes:

- GenoType MTBC: permite discriminar entre los miembros de *M. tuberculosis complex*.
- GenoType CM: permite tipificar a las 14 micobacterias de mayor interés clínico.
- GenoType AS: amplía el estudio a 16 micobacterias adicionales.

Con estas tecnologías en aproximadamente 5 horas conseguimos poner nombre y apellidos a la micobacteria que estamos analizando, lo que nos permite afinar los tratamientos a la espera de que obtengamos un patrón de resistencias completo.

GeneXpert

Tras haber expuesto brevemente estas dos técnicas, nos centraremos en un método que ha supuesto una revolución, no sólo en el diagnóstico directo de la tuberculosis, sino en la detección genotípica de sus resistencias. Se trata del sistema GeneXpert (Cepheid®,

USA), desarrollado por iniciativa privada en consorcio con la Fundación Bill y Melinda Gates, que constituye una herramienta de diagnóstico molecular rápida y sencilla de utilizar (figuras 14 y 15).

La técnica utiliza unos cartuchos especialmente diseñados para el microorganismo que se quiere estudiar, ya que existen diferentes modalidades para distintos microorganismos. En la técnica, primero hay que recoger un inóculo de la muestra clínica, suspenderlo en un buffer bactericida (o añadir el buffer al esputo en muestras respiratorias) y dejarlo incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añade un volumen determinado al cartucho comercial, el cual contiene en su interior todos los reactivos necesarios para la lisis de las bacterias, la extracción del ADN, su posterior amplificación, y la detección mediante sondas que hibridan con los segmentos de DNA diana, relacionados con la identificación de *M. tuberculosis* complex y la resistencia a rifampicina (21).

Una vez preparado, el cartucho se introduce en un módulo y comienza la prueba. Esta sistemática de trabajo tiene la ventaja de que la exposición del operario es muy limitada, por lo que no se necesitan más medidas de bioseguridad que las aconsejadas para realizar una tinción de esputo. El test tarda alrededor de dos horas en dar los resultados.

Lo que el aparato aplica sobre la muestra es una PCR anidada en tiempo real, en la que se amplifica la región que contiene la secuencia de *rpoB* tras amplificar el material genético de *M. tuberculosis*. Una vez que la maquina ha finalizado con los ciclos de amplificación, las sondas de ADN hibridan con las regiones específicas de *M. tuberculosis* y de *rpoB*, demostrando su presencia mediante una reacción de fluorescencia que es monitorizada en todo momento y que es detectada en caso de estar ante una cepa resistente a la rifampicina. No se han detectado reacciones cruzadas con micobacterias no tuberculosas. El test ha demostrado tener una sensibilidad para la detección de *M. tuberculosis* del 98.2% en aquellas muestras con baciloscopia positiva y del 72.5% en las que la baciloscopia fue negativa. Su especificidad es del 99.2%. En cuanto a la resistencia frente a rifampicina la prueba tiene una sensibilidad del 97.6% y una especificidad del 98.1% (21).



Figuras 14 y 15. Cartucho de GeneXpert y sistema de detección.

El impacto de esta técnica es considerable ya que permite diagnosticar a un paciente de tuberculosis en un único día y de manera simultánea determinar la multirresistencia farmacológica, ya que en la mayoría de las ocasiones la resistencia a rifampicina se asocia con la resistencia a isoniazida. Debido a estas razones, la OMS recomendó en

2010 que esta técnica fuera de elección en el diagnóstico inicial en pacientes sospechosos de MDR-TB y en pacientes coinfectados con VIH en áreas donde la prevalencia de ambas sea muy alta. En zonas con una prevalencia menor, se recomienda realizar primero una baciloscopia y después aplicar el GeneXpert en función del criterio médico, especialmente en aquellos pacientes con baciloscopias negativas (22). A pesar de realizar esta prueba, la OMS deja constancia que las pruebas convencionales han de seguir aplicándose (baciloscopia, cultivo y antibiograma) para monitorizar al paciente un confirmar el diagnóstico.

La prueba del GeneXpert ha sido diseñada para aplicarse sobre muestras respiratorias y así descartar o no la presencia de tuberculosis pulmonar, pero cada vez más va surgiendo literatura sobre sus aplicaciones en los casos de tuberculosis extrapulmonar. La evidencia publicada hasta ahora no es tan uniforme como la redactada sobre muestras respiratorias, pero está claro que los beneficios potenciales que aporta esta prueba sobre el diagnóstico de las formas extrapulmonares son muy prometedores. La sensibilidad sobre muestras extra respiratorias se estima del 81.3% y la especificidad del 99.8% (23). A pesar de ser inferior que, en muestras respiratorias, el diagnóstico precoz que puede ofrecer hace que sea un recurso valioso. Hay que tener en cuenta, no obstante, que estos resultados no son homogéneos para todo tipo de muestras, la sensibilidad varía en función del origen y tipo de muestra que se emplea para la prueba.

Tipo de muestra	Sensibilidad
Biopsia	>75%
Punción-aspiración con aguja fina	88.3%
Aspirado gástrico	78.7%
Muestra de pus	87.3%
Líquido cefalorraquídeo	85.7%
Orina	87.5%
Líquido pleural	44.4%
Otros: líquido pericárdico, peritoneal y sinovial	50%

Figura 16. Variabilidad de sensibilidad de GeneXpert en función de la muestra clínica (23).

Como podemos ver en la figura 16, no resulta rentable aplicar este test en todos los tipos de muestras clínicas. Es necesario ser cauteloso y sopesar cada caso de forma individual. Así, por ejemplo, hay que destacar los beneficios de descartar o confirmar de forma rápida una meningitis tuberculosa debido a lo grave que puede ser este cuadro, por lo que la indicación del GeneXpert es más clara. En cambio, sobre muestras de líquido pleural o de otras serosas la rentabilidad de esta prueba está más en entredicho, por lo que su uso es controvertido. Todavía no exista evidencia que aconseje implantar de forma sistemática su empleo en estos casos, por lo tanto, ha de ser utilizada ajustada al criterio médico.

Esta técnica reúne las características necesarias para ser realmente útil en aquellas áreas con alta prevalencia de MDR y de VIH y en las que se disponga de unos recursos limitados para identificar a los pacientes, diagnosticarlos y realizar un seguimiento. Además, con los pocos requerimientos técnicos que necesita esta máquina, es bastante sencillo formar al personal para que pueda utilizarla. El problema es el precio del aparato y de los cartuchos, ya que cada uno ronda los 70 euros. Para subsanar este problema, la OMS editó una lista de países en los que consideraba prioritario implantar esta técnica y, tras llegar a un acuerdo con la empresa fabricante, ha lanzado un programa de subsidios para que los centros públicos de estos países puedan acceder al GeneXpert. Con esta medida se ha conseguido llevar esta técnica a las zonas donde el impacto sobre el curso de la tuberculosis puede ser mayor. De esta forma, la OMS recomienda que en los laboratorios situados en zonas con bajos niveles de ingresos o medios se sustituya la tinción de esputo (baciloscopia) por el GeneXpert sobre esputo como primera medida diagnóstica (22).

En cambio, en las regiones del planeta con mayores recursos económicos y con una menor prevalencia de la tuberculosis, la implantación del GeneXpert es algo más controvertida. La mayoría de pacientes son detectados precozmente por los sistemas sanitarios y disponen de laboratorios más sofisticados y con mayor acceso diferentes pruebas. Además, los protocolos de despistaje aplicados ante la mínima sospecha y sobre la población inmigrante son elementos clave que contribuyen a la detección precoz de la tuberculosis. Gracias a estas medidas, se detecta la enfermedad en estadios más precoces, en los que la capacidad de generar muestras con una gran concentración de bacilos es menor y, por lo tanto, disminuye la sensibilidad de la prueba. También hay que destacar que el algoritmo diagnóstico de tinción de esputo con cultivo además de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos suele ser suficiente para dar un diagnóstico de confirmación (24).

En resumen, utilizar el GeneXpert de entrada en todos los pacientes susceptibles de tener tuberculosis no es coste-efectivo en nuestro sistema, pero sí que existen situaciones en las que está indicado realizar esta prueba, como en pacientes con inmunodeficiencias, situaciones en las que el diagnóstico sea urgente y en aquellos pacientes en los que la tinción de esputo haya sido negativa, como ya hemos mencionado. Aunque la sensibilidad sea menor en este último caso, el diagnóstico precoz que puede propiciar supone un ahorro en otras pruebas complementarias y, sobre todo, un ahorro en estancia hospitalaria (25).

3.4 Pruebas de sensibilidad a fármacos

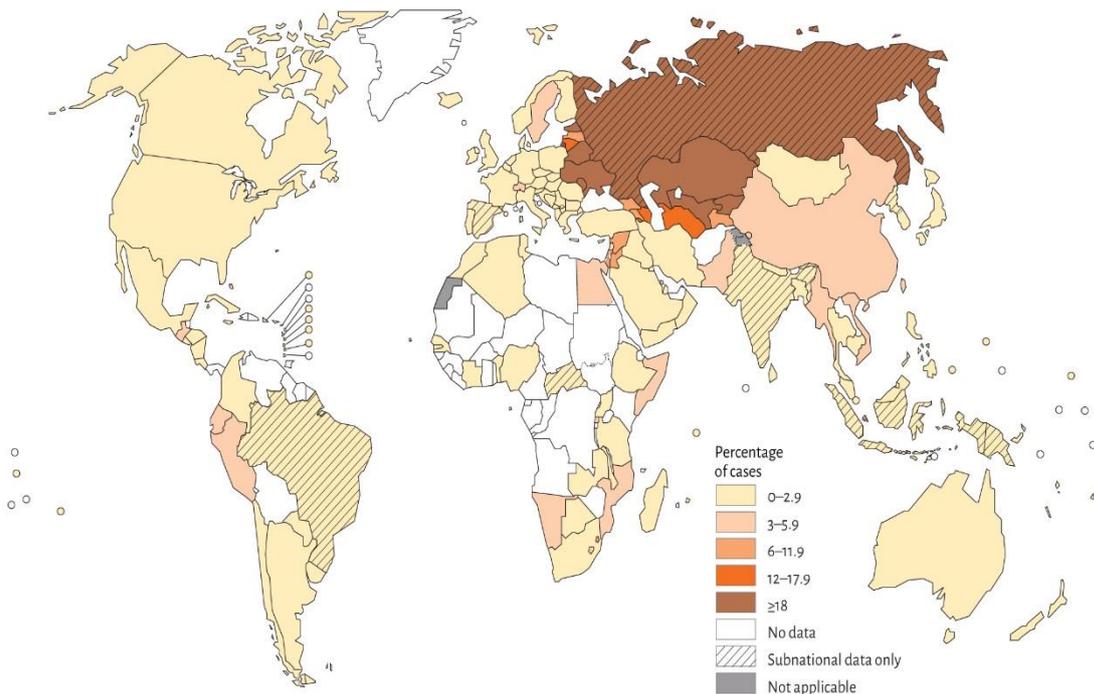
Una identificación correcta y lo más precoz posible de cepas resistentes al tratamiento antituberculoso es de vital importancia. Es un problema de envergadura global ya que si no se detecta en su debido momento y se aplican terapias ajustadas al perfil de resistencias que posee la bacteria, paulatinamente se irán seleccionando estas cepas resistentes, irá aumentando su incidencia y se irá agotando el arsenal terapéutico contra ellas. Como ya indicamos en el comienzo de esta revisión, el incremento de casos de tuberculosis MDR es uno de los temas que más preocupa actualmente.

En 1994 se lanzó el “*Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance*”, que lleva durante más de 20 años recopilando todos los casos de tuberculosis declarados

a nivel mundial. A raíz de ello, se ha estimado que en 2015 hubo 480.000 casos tuberculosis MDR y 100.000 casos de tuberculosis resistente a la rifampicina de los que el 21% habría recibido tratamiento previo antituberculoso (1). El 45% de estos 580.000 casos se reparte entre India, China y Rusia, aunque hay que resaltar el hecho de que varios países africanos todavía no tienen redes de vigilancia eficientes ni capacidad para declarar los casos que encuentran (figura 17). En las proyecciones realizadas por la OMS también se ha estimado que el 9.5% de estos casos eran en realidad tuberculosis XDR. Los sistemas de vigilancia declararon finalmente 123.000 casos de XDR, de los cuales 110.000 tuvo acceso a tratamientos de segunda línea (1).

■ FIGURE 4.2

Percentage of new TB cases with MDR-TB^a



^a Figures are based on the most recent year for which data have been reported, which varies among countries. Data reported before the year 2000 are not shown.

Figura 17. Porcentaje de nuevos casos de tuberculosis MDR. Imagen tomada de (1).

Esto refleja una situación potencialmente peligrosa, ya que no se puede determinar completamente la envergadura real del problema al haber puntos en los que los sistemas de detección resistencias están fallando o son inexistentes, y además los planes terapéuticos se están aplicando de forma incorrecta por la falta de información. Como última consecuencia de esta encrucijada se está propiciando un caldo de cultivo en aquellas regiones con recursos más limitados, lo que supone una amenaza global ya que las dinámicas migratorias actuales impiden contener su propagación, por lo que se han declarado ya múltiples casos importados en zonas más desarrolladas.

Para atajar este problema, se han desarrollado varias técnicas diagnósticas que nos permiten determinar el patrón de resistencias de *M. tuberculosis* y optimizar en función

de este el tratamiento. Estas pruebas se dividen principalmente en dos grupos: fenotípicas y genotípicas

3.4.1 Técnicas fenotípicas

Desde el punto de vista microbiológico, una cepa de *M. tuberculosis* se clasifica como resistente a un antibiótico cuando el 1% o más de la población bacteriana es capaz de crecer y multiplicarse en presencia de una determinada concentración de fármaco. La resistencia del microorganismo es clínicamente significativa cuando al menos un 1% del total de la población bacteriana es resistente a la concentración crítica, es decir, la concentración más baja a la que los bacilos sensibles son incapaces de crecer en presencia de ese fármaco (26).

El método de las proporciones y las concentraciones críticas establecido por Cannetti y Grosset sigue siendo en la actualidad el *gold standard*, y fundamentó las técnicas de antibiograma que se desarrollaron a partir de 1963 (2). Para determinar la proporción de bacterias resistentes a la concentración de antibiótico estudiada, la técnica compara el crecimiento bacteriano de una cepa con antibiótico con otra dilución 1/100 de la misma cepa sin antibiótico. Los antibiogramas sobre medio de cultivo sólido, como el Löwenstein-Jensen o el Middlebrook 7H10 o 7H11, han dejado de tener tanto peso entre las técnicas de detección fenotípica debido a su lentitud (4 semanas de incubación) y los inconvenientes derivados de su manipulación manual.

Las técnicas semiautomatizadas de detección sobre cultivo líquido han desplazado a estas primeras debido a su rapidez y facilidad de ejecución. Los tres sistemas más ampliamente empleados son: BACTEC MGIT960, Mb BacT y VersaTREK (10). Los tres sistemas han demostrado ser equivalentes entre ellos, aunque el sistema BACTEC MGIT960 (figura 11) fue el que reemplazó al método radiométrico BACTEC 460TB, considerado el método de referencia durante más de 20 años. En la sección de medios de cultivo hemos comentado sus fundamentos y en las pruebas de sensibilidad se emplean de la misma manera, con la salvedad de que se incorporan antibióticos a los medios de cultivo para poder estudiar el crecimiento bacteriano frente a ellos.

El antibiograma frente a los fármacos de primera línea es un proceso plenamente estandarizado y validado. Está indicada su realización en todos los aislamientos nuevos, ya que es la mejor manera de detectar resistencias de bajo nivel, o monorresistencias, que no se habrían detectado en las primeras fases del tratamiento, evitando que se seleccionen las cepas más resistentes. También es necesario realizarlo en casos de fracaso terapéutico, recidiva, persistencia de baciloscopia positiva a pesar de tratamiento, o en casos de contacto de portador con resistencia conocida.

La técnica consiste en incorporar en cada tubo el antibiótico o la concentración prefijada que se desea estudiar y se le añade un inóculo de 5×10^5 bacterias/ml. Estos tubos se comparan con un control que contiene un inóculo 100 veces inferior al de los tubos problema. Se introducen todos los tubos en la máquina y se dejan incubar entre 5 y 12 días. En el antibiograma de primera línea se testan los 4 fármacos (isoniazida, etambutol, rifampicina y pirazinamida) de la terapia estándar, más la estreptomycin. La pirazinamida hay que estudiarla por separado con un control propio debido a que se activa con un pH de 5. Para poder realizar la prueba se acidifica un medio de cultivo a

pH 6 por separado y se le añade una concentración de antibiótico 4 veces mayor a la que queremos comprobar (debido a que una importante proporción de él se nos va a inactivar) y un control con un inóculo 100 veces menor.

Estos sistemas monitorizan el crecimiento bacteriano de forma continua y automática. El sistema BACTEC MGIT960, el de implantación más amplia, lo hace por un método fluorométrico, como se ha comentado en el apartado de medios de cultivo. De esta manera se registra diariamente el índice de crecimiento tanto en los tubos problema como en los de control, hasta que el tubo de control alcanza un punto de corte determinado, momento en el que se comparan ambos crecimientos bacterianos y se clasifica a la cepa como sensible o resistente en función de si tiene menor o mayor proporción de crecimiento bacteriano en el tubo problema con respecto al control (8).

De forma rutinaria, en los antibiogramas de primera línea se determinan diferentes niveles de concentración fijos para varios de los antibióticos, para poder diferenciar entre cepas con resistencias de bajo nivel pero que son sensibles a concentraciones mayores del mismo antibiótico (figura 18).

	Concentración menor	Concentración superior	Concentración única
Isoniazida	0.1 µg/ml	1 µg/ml	-
Etambutol	2,5 µg/ml	5 µg/ml	-
Estreptomina	1 µg/ml	4 µg/ml	-
Rifampicina	-	-	1 µg/ml
Pirazinamida	-	-	100 µg/ml

Figura 18. Concentraciones prefijadas en antibiograma de primera línea (26).

Este método lo que nos permite es evitar la retirada de fármacos del plan terapéutico, aunque si determina la necesidad de modificarlo incrementando la dosis del antibiótico que no sea completamente efectivo en concentraciones bajas y añadiendo otros fármacos al mismo para asegurarnos de que no se generan nuevas y más complejas resistencias.

En caso de que el antibiograma salga alterado, se puede recurrir a una repetición del mismo (modificando de forma paralela el tratamiento de la manera que se precise) o se puede recurrir a una prueba genética, dirigida al patrón de resistencias que hemos detectado. Hay que considerar siempre la posibilidad de estar tratando con un *M. bovis* cuando se detecta una resistencia a pirazinamida. También está indicado la realización de un antibiograma de segunda línea, pero en este caso no hay un procedimiento estándar a seguir y los protocolos son muy dispares. Se aconseja que estas pruebas las realicen laboratorios con experiencia y que la interpretación de los resultados se haga contextualizada en la clínica del paciente y de forma cautelosa. Entre los fármacos que se testan con más frecuencia están los siguientes; amikacina, tobramicina, capreomicina, etionamida, clicloserina, oxoflaxino, levofloxacino, clofazolina, lineozolid.

Estas técnicas están plenamente instauradas en los laboratorios de nivel 3 (ver más adelante), y en aquellos centros que no se pueden costear el precio de una incubadora automatizada los antibiogramas se realizan manualmente sobre medios de cultivos líquidos preferiblemente, debido a su mayor sensibilidad y a su menor tiempo de incubación.

Para finalizar con este apartado de técnicas fenotípicas disponemos del test de susceptibilidad a fármaco observado por microscopia (MODS, según sus siglas en inglés). La técnica consiste en detectar el crecimiento de las microcolonias de *M. tuberculosis* inoculadas en una placa con múltiples pocillos de medio de cultivo líquido, la cual es sellada tras la introducción de inóculo. Para ello se utiliza un microscopio de luz invertida con el que se busca demostrar la presencia del factor de crecimiento cordonal, propio de las especies de *M. tuberculosis complex*. Para realizar la prueba es necesario preparar de forma previa las muestras de esputo, que son sometidas a un proceso de digestión, descontaminación y concentración.

Una vez cumplimentado este paso, se preparan dos inóculos que son inyectados en una placa de pocillos con antibiótico y otra sin antibiótico que actúa de control. Con este método se comprueba directamente la susceptibilidad de la cepa que contiene la muestra a isoniazida y rifampicina. La bibliografía recoge que es más sensible y rápido en la detección de resistencias provenientes de muestras respiratorias que los medios semiautomatizados de cultivo líquido y los antibiogramas sobre medios sólidos debido a que esta técnica aporta resultados a los 7 días y los otros dos métodos tardan 13 y 26 días, respectivamente (10).

La principal ventaja de esta técnica son sus menores requerimientos técnicos (se necesita el microscopio de luz invertida, una centrifugadora con garantías de bioseguridad, medios de cultivo líquidos y las placas con los pocillos) para realizarla. Pero existen varios inconvenientes, ya que, si se quieren hacer más pruebas diagnósticas a partir de las colonias cultivadas, es necesario abrir las placas que estaban selladas con unas garantías de bioseguridad más estrictas que las necesarias en otras técnicas como las semiautomatizados o las que emplean medios de cultivos sólidos. También se necesita personal bien formado en técnicas de microscopia y estudios más rigurosos que avalen la seguridad del proceso.

3.4.2 Técnicas genotípicas

Las principales técnicas moleculares están orientadas a detectar las mutaciones que confieren resistencias frente a la rifampicina, la isoniazida y la piraminazida. La mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento se encuentran en genes que codifican a diversas enzimas que interactúan en mayor o menor medida con estos fármacos y que son necesarias para que actúen de forma correcta y eficaz (figura 19). Las modificaciones que sufren estas enzimas como consecuencia de las mutaciones alteran la acción de estos medicamentos, haciendo que su efecto quede reducido y evitando que la cepa de *M. tuberculosis* sea eliminada a pesar de pautar un tratamiento contra ella.

Fármaco	Gen	Mecanismo de resistencia
Rifampicina	<i>rpoB</i> (codones 507-533)	Codifica subunidad β de la ARN polimerasa.
Isoniazida	<i>katG</i>	Codifica la enzima catalasa-peroxidasa.
	<i>inhA</i>	Codifica la enzima enoil ACP reductasa.
	<i>kasA</i>	-
	Región intergénica de complejo <i>oxyR-aphC</i>	-
Pirazinamida	<i>pncA</i>	Codifica la enzima pirazinamidasa.

Figura 19. Genes implicados en la resistencia a Rifampicina, Isoniazida y Pirazinamida (15).

En lo que se refiere a la resistencia a la rifampicina, el 95% de las cepas resistentes poseen la mutación en una región (RRDR) de 81 bp del gen *rpoB*, por lo que la detección genética de la resistencia a rifampicina ha sido más sencilla y rentable. En cambio, la detección de la resistencia a isoniazida resulta más compleja debido a su carácter poligénico, pero se han descrito varias dianas de amplificación que se emplean en su diagnóstico (figura 19). Una de las mutaciones más importantes es la localizada en el codón 315 del gen *katG*, que codifica la catalasa, que confiere una resistencia de alto grado (>1 μ g/ml) (15).

El método de referencia para detectar una alteración genotípica que confiere resistencia a una cepa frente a un medicamento es la secuenciación del genoma bacteriano. Lo ideal sería secuenciar las dianas descritas y comprobar si existe una mutación entre ellas. Además, nos permite diferenciar si la mutación detectada es silente o tiene expresión génica. El problema es que esta técnica resulta muy ardua de realizar y requiere un personal especializado que disponga de unas instalaciones bien equipadas. Por ello resulta muy difícil de realizar en los laboratorios de categorías inferiores que tengan un gran flujo de muestras, ya que el coste y el tiempo que implicaría secuenciar cada una de las muestras no puede ser asumido por estos centros.

Para dar una solución a estos problemas que surgen con la secuenciación, varias casas comerciales han desarrollado métodos que permiten detectar mutaciones de una manera más sencilla y precoz, permitiendo que los pacientes sean tratados de manera eficaz cuanto antes. Entre este grupo de técnicas moleculares que se encuentran en el mercado, destacan: InnoLiPA Rif TB, GenoType MTBDRplus y GeneXpert.

InnoLiPA Rif TB se utiliza para detectar rápidamente cepas resistentes a la rifampicina. La técnica consiste en realizar una PCR amplificando la región que contiene el gen *rpoB*. El material genético amplificado se suspende sobre una membrana de nitrocelulosa, que

posee varias sondas que hibridan con él. Esta técnica nos permite identificar a *M. tuberculosis* a partir de una muestra de esputo y detectar las mutaciones más frecuentes de *rpoB* (D516V, H526V, H526D y S513L) (10). Tiene una sensibilidad del 92.1% y una especificidad del 99.3% (27). Por otro lado, el **GenoType MTBDRplus** es una técnica similar a la anterior que permite detectar tanto resistencias frente a la rifampicina como a la isoniazida, ya que incluye sondas que hibridan con *katG* e *inhA*. Esta prueba tiene una sensibilidad para detectar la resistencia a la rifampicina del 94.7% y, en el caso de la isoniazida, del 98.8%, con una especificidad del 98.9% (10).

Ambas pruebas son de utilidad para detectar cepas aisladas procedentes de esputos con baciloscopias positivas, aunque su sensibilidad está bastante influenciada por la prevalencia de *M. tuberculosis* MDR propia del entorno. Un problema que presenta estas técnicas es su baja sensibilidad en muestras con baciloscopias negativas, por lo que es necesario recurrir a un antibiograma al uso o ampliar el estudio con otras pruebas. En relación a la última técnica, el **GeneXpert**, ya ha sido detallada anteriormente.

4 Epidemiología de la infección por MTB

La reemergencia de la tuberculosis en el mundo ha despertado el interés en el entendimiento de la epidemiología y patogénesis de esta enfermedad. Un revolucionario avance en este campo de investigación ha sido el desarrollo de técnicas moleculares que permiten identificar y establecer la huella particular de cada cepa de *M. tuberculosis*. Con el uso de estas técnicas se adicionó otra dimensión a la epidemiología clásica de la tuberculosis y ha incrementado el conocimiento de la dinámica de la transmisión de *M. tuberculosis* dentro de una población. Otras metodologías genotípicas han sido desarrolladas a partir del conocimiento de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis*. Estas metodologías genotípicas, especialmente las de fácil implementación y bajo costo, se deben aplicar en países en vía de desarrollo, donde existe el 90% de la enfermedad, como apoyo a los programas de control de la tuberculosis. Estas herramientas permitirán conocer la dinámica de transmisión de la tuberculosis, la estructura de la población, la evolución y patogénesis de *M. tuberculosis*.

4.1 Tipificación molecular

Para la identificación de cepas, durante mucho tiempo se han utilizado marcadores que se basan en las características expresadas por los microorganismos (fagotipia, antibiotipia, serotipia). Actualmente estas técnicas fenotípicas se están sustituyendo por técnicas moleculares que analizan la huella genética. Se han desarrollado diversos métodos de tipificación que se basan en el análisis del grado de similitud y distribución de estos elementos variables entre los aislamientos, en el estudio de la presencia o ausencia de determinados fragmentos de ADN y en la comparación del genoma completo del microorganismo (28).

A continuación, se describen algunas de estas técnicas.

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP). Es el método más utilizado y el que se considera de referencia. Se realiza siguiendo un protocolo estandarizado (29) que analiza la secuencia

de inserción IS6110 y es una técnica muy reproducible y útil para distinguir entre los aislamientos relacionados epidemiológicamente de los no relacionados, de modo que se ha utilizado como indicador de transmisión reciente. Se basa en estudiar el número de veces que la secuencia IS6110 se repite en el genoma de la micobacteria (generalmente entre 0 y 25 veces). Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones, ya que no puede utilizarse si la micobacteria tiene menos de 6 copias de este fragmento en su cromosoma, en cuyo caso es preciso la utilización de otras técnicas. Además, requiere grandes cantidades de ADN (lo que implica la realización de subcultivos que precisan varias semanas), es técnicamente complejo y caro (30).

Spoligotyping. Es un método muy utilizado por su relativa simplicidad, rapidez y bajo coste, generalmente como complemento del anterior. Este método estudia la presencia o ausencia de 43 fragmentos de ADN, llamados espaciadores. Requiere menos ADN que el RFLP y, al expresarse en forma de positivo o negativo (presencia/ausencia de cada espaciador), puede analizarse en un formato digital. Existe una base de datos internacional (“espiligotipos”) de aislamientos obtenidos en más de 90 países (31). Sin embargo, este método no reemplaza por completo al RFLP por su menor poder discriminante (32).

Número variable de repeticiones en tándem (*variable number tandem repeat, VNTR*). El método se basa en la detección del número de veces que se repiten de forma adyacente varias secuencias dentro del genoma de la micobacteria. El más utilizado es el *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable- number tandem repeat analysis* (MIRU-VNTR), que determina las unidades repetitivas en 12 *loci* con un método de PCR. En cada uno de los 12 *loci* hay de 2 a 8 alelos, lo que da lugar a unos 20 millones de posibles combinaciones de alelos. El MIRU-VNTR es más discriminante que el *spoligotyping* y similar al basado en RFLP-IS6110. El método, además, se puede automatizar y técnicamente es más simple, por lo que es previsible que se imponga como método de referencia. Además, existe también una base de datos internacional accesible por Internet para poder comparar los hallazgos (33).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorphism, AFLP*). Se diferencia de los otros métodos en que estudia todo el genoma de la micobacteria, por lo que podría ser más específico que el RFLP para confirmar la transmisión reciente de una cepa (34). Sin embargo, este método, basado en amplificación por PCR, es caro, requiere mucho tiempo y personal muy especializado. Su posible aplicación en estudios de epidemiología molecular todavía debe evaluarse con más profundidad.

5 Diagnóstico de infección latente

La mayoría de infecciones por *M. tuberculosis* ocurren sin que debute ningún signo clínico o radiológico que permita identificarla. Los individuos que consiguen contener la infección gracias a su sistema inmunológico pasan a un estado de infección latente, que conlleva un riesgo de un 4%-6% de desarrollar una tuberculosis activa si no se les identifica correctamente y se les pone tratamiento. Es importante recordar que el riesgo máximo de desarrollar una tuberculosis activa se encuentra en los dos primeros años,

por lo que un cribado temprano de los contactos tras diagnosticar una tuberculosis es importante.

Hay que tener en cuenta, además, que ciertos grupos de población no son capaces de contener la primoinfección de una manera eficiente. Por ello hay que prestar especial atención a los niños (especialmente a los menores de 4 años) y a pacientes con antecedentes de silicosis, diabetes mellitus o a pacientes con enfermedades inmunosupresoras o como resultado de ciertas terapias (corticoides, metrotexato, antiTNF- α ...) ya que sus probabilidades de padecer la enfermedad son mayores que la población general. Ya se ha señalado la relación entre la infección por VIH y la tuberculosis, donde existe la probabilidad de un 5%- 10% al año de desarrollar una tuberculosis activa en aquel individuo que se ha infectado por VIH y previamente había sido infectado de forma latente por *M. tuberculosis*.

El diagnóstico de la infección latente se aplica sobre tres tipos de pacientes:

- Aquellos clasificados como contacto de un paciente con tuberculosis activa.
- Pacientes que sufren una inmunosupresión severa.
- Pacientes subsidiarios de terapia inmunosupresora.

El objetivo es identificar a aquellos individuos que se beneficiarán de una quimioprofilaxis, especialmente los dos últimos. Para ello disponemos de dos tipos de técnicas: la prueba de la tuberculina y las técnicas de detección de interferón específico (IGRAs).

5.1 Prueba de la tuberculina

Es la técnica que más se ha generalizado en el cribado de la infección tuberculosa. La técnica consiste en inyectar de forma intradérmica 0.1 ml de derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD, por sus siglas en inglés) en la cara anterior del antebrazo, estimulando a la inmunidad celular y generando una reacción de hipersensibilidad tipo IV. Es lo que se conoce como método Mantoux. Es necesario esperar entre 48 y 72 horas para poder leer el resultado de la prueba, que se realiza midiendo el diámetro de la induración palpable que aparece en el antebrazo. Las reacciones adversas a esta prueba son raras, pero pueden producirse vesículas y úlceras en la zona que ha sido inoculada con el derivado proteico (figura 20).

La sensibilidad de la prueba en pacientes sin patología grave previa es de un 95%-98% (2). El problema nos lo podemos encontrar en situaciones que pueden dar un falso negativo, como en niños pequeños debido a la inmadurez de su sistema inmunológico, en pacientes infectados hace menos de 6 u 8 semanas en los que la respuesta inmune celular puede que no esté completamente desarrollada, tras la administración de vacunas con virus vivos, o en los casos de tuberculosis activa diseminada o infección tuberculosa antigua. También en enfermedades o tratamientos inmunosupresores que provoquen una anergia cutánea, o debido a un fallo por la inexperiencia del personal encargado de administrar o leer la prueba.

Los falsos positivos se dan en aquellas personas que hayan sido vacunadas previamente con la BCG ya que altera la especificidad del test, o en individuos que residan en zonas

con alta incidencia de infecciones por micobacterias no tuberculosas, las cuales pueden dar también positivo al test.

Clasificación de la reacción a la prueba cutánea de la tuberculina
<p>La induración de 5 milímetros o más se considera una reacción positiva en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Personas infectadas por el VIH. • Contacto reciente con otra persona enferma de tuberculosis. • Personas con cambios fibróticos que se observen en la radiografía de tórax indicativos de una tuberculosis previa. • Pacientes que hayan recibido trasplantes de órganos. • Personas inmunodeprimidas por otras razones (p. ej., que estén tomando el equivalente a >15 mg/día de prednisona durante 1 mes o más, o antagonistas de-TNF- α).
<p>La induración de 10 milímetros o más se considera una reacción positiva en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pacientes provenientes de países con alta prevalencia. • Usuarios de drogas inyectables. • Residentes y empleados de establecimientos o instituciones que congregan a grupos de alto riesgo. • Personal de laboratorios de análisis micobacteriológico. • Personas con afecciones o trastornos que las predispongan a un riesgo elevado. • Niños < 4 años de edad. • Bebés, niños y adolescentes expuestos a adultos que pertenezcan a grupos de riesgo elevado.
<p>La induración de 15 milímetros o más:</p> <p>Se considera una reacción positiva en todas las personas, incluso en las que no tengan factores de riesgo conocido de tuberculosis. Deben realizarse en grupos de alto riesgo.</p>

Figura 20. Lectura de la prueba de la Tuberculina (35)

Las razones por la que esta prueba se ha implantado en la mayoría de los centros sanitarios a nivel mundial son sus bajos requerimientos para poder realizarla, ya que no necesita un laboratorio o equipo especializado. Simplemente con un trabajador entrenado para administrar la prueba y después leerla es suficiente. Se puede llevar a lugares remotos, no se necesita sacar sangre a los pacientes y sus costes son muy bajos.

Entre sus inconvenientes encontramos la necesidad de tener a personal bien entrenado, la variabilidad interobservador e intraobservador a la hora de leer los resultados y la necesidad de volver a desplazarse para poder leerlos, factor que puede ser determinante en zonas muy empobrecidas. Por último, recordar las situaciones en las cuales la sensibilidad y la especificidad de la prueba se alteran, como hemos comentado al relatar los posibles falsos negativos y falsos positivos, por lo que es necesario una correcta anamnesis para no pasarlos por alto.

5.2 Técnicas de detección de interferón

Se trata de unas técnicas *in vitro* que cuantifican la cantidad de interferón γ (IFN- γ) liberado por los linfocitos T CD4⁺ tras ser estimulados con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Existen dos técnicas comercializadas actualmente, el QuantiFERON TB-Gold-Plus (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) y el T-SPOT.TB test ((Oxford Immunotec Ltd, Abingdon, United Kingdom). El primero utiliza un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para cuantificar la liberación de interferón γ , y el segundo un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT).

La técnica más extendida en su aplicación clínica es la del QuantiFERON TB-Gold-Plus que utiliza dos antígenos, ESAT-6 y CFP-10, capaces de desencadenar una fuerte reacción inmunológica sobre los linfocitos y más específica que la realizada con el derivado proteico purificado de la tuberculina (2). Esta característica se debe a que el gen que codifica las regiones correspondientes a estos antígenos se encuentra ausente en las cepas de *M. bovis* que se utilizan para la vacunación BCG y también la mayoría de micobacterias no tuberculosas, con la excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* y *M. leprae* (20). Gracias a ésto se evitan reacciones cruzadas que puedan producir falsos positivos. Por otro lado, esta prueba tiene una mayor sensibilidad en pacientes inmunodeprimidos que la prueba de la tuberculina, lo cual la hace más atractiva.

El QFN-TB-Plus ha sido aprobado por la FDA y es el que más ha sido utilizada hasta el momento. Se necesita sacar sangre al paciente (4 ml) que se han de introducir en 4 tubos recubiertos con antígenos liofilizados, y uno control, a razón de 1 ml cada uno. Se dejan incubar 16-24 horas a 37°C y se extrae el plasma, cuantificando la cantidad de IFN- γ mediante un ELISA (figura 21).



Figura 21. Tubos de recogida de sangre para el QuantiFERON TB-Gold-Plus

La técnica del T-SPOT.TB también ha sido aprobada por la FDA recientemente, aunque se están revisando los criterios para interpretar sus resultados. En esta prueba se debe extraer también sangre al sujeto (un mínimo de 2 ml) e introducirla en un tubo heparinizado o en un tubo tipo CPT Ficoll (contiene citrato de sodio), tras lo que deber

de ser procesada en un plazo de 8 horas. Se separan las células mononucleares periféricas mediante una centrifugación por gradientes de densidad y se realiza un conteo de linfocitos. También se sacan tubos para actuar de controles. Después se vierten estas células sobre una placa con micro pocillos recubiertos con anticuerpos contra interferón γ (ELISPOT) y se añaden los antígenos de *M. tuberculosis*. Se deja incubar durante una noche (16-20 horas) a una temperatura de 37°C y después se lavan las células, y se revela la presencia del interferón γ mediante una conjugación con un anticuerpo secundario. Los resultados de la prueba se miden en unidades formadoras de puntos (SFU en sus siglas en inglés) (20).

Ya hemos enumerado alguno de los beneficios que suponen estas pruebas frente a la de la tuberculina, si bien su sensibilidad y especificidad resulta complicado de cuantificar ya que no hay una prueba *gold standard* con la que se pueda comparar. A este hecho se le suma la variabilidad de resultados que podemos encontrar, y que responde a varios eventos:

- El tipo de ensayos (ELISA, ELISPOT) que se utilizan para cuantificar los resultados.
- La dificultad de reproducir una compleja reacción biológica.
- La variabilidad natural de la respuesta inmune.
- Las alteraciones que se puedan introducir durante la realización del test.

Se ha descrito una variabilidad intrasujeto de un 8% entra la primera prueba y la segunda, usando el QFN-TB sobre plasma almacenado (20).

Otros problemas que hemos de afrontar con estas pruebas es su mayor coste, la necesidad de infraestructuras para realizarlo, y la interpretación de las pruebas. También destacar que esta prueba no es capaz de discriminar si un paciente padece enfermedad activa o latente y que tiene ciertos problemas de precisión en casos de tuberculosis extrapulmonar, en inmunodeprimidos, especialmente en VIH+ con CD4<200 células/ml, y con los niños menores de 5 años.

6 Niveles de los laboratorios de micobacteriología

Debido a los diversos requerimientos que exigen cada una de las técnicas diagnósticas, desde los recursos logísticos que precisan hasta la experiencia del personal responsable de realizarlas, se ha establecido una clasificación que estratifica a los laboratorios clínicos en función de su capacidad para gestionar las muestras clínicas y ofertar todas las pruebas diagnósticas posibles.

Nivel 1

Serían los laboratorios capacitados para realizar tinciones de ácido-alcohol resistencia y la recogida, almacenamiento y envío de muestras a laboratorios de nivel superior para su cultivo. Los requerimientos son sencillos, con un microscopio y una mesa de trabajo es suficiente. Se recomienda aplicar medidas de bioseguridad cuando se manipulen las muestras al realizar las tinciones. Lo ideal sería que se realizaran en una cabina de bioseguridad, aunque no es estrictamente necesario (36).

Nivel 2

Son aquellos laboratorios capaces de realizar las tareas del nivel 1 y además puedan realizar el cultivo de las muestras e identificarlas mediante el uso de sondas comerciales. También están capacitados para realizar subcultivos de la muestra, almacenarlos y enviar los aislamientos a laboratorios de categoría superior para completar el estudio. En este caso, la manipulación de las muestras y los cultivos exige una seguridad biológica de nivel 3 (36) (figura 6).

Nivel 3

Este nivel lleva implícito la necesidad de garantizar un nivel 3 de seguridad biológica para poder realizar de forma correcta y segura las pruebas diagnósticas. En este nivel encontramos un amplio grupo de laboratorios que se diferencian en función de las pruebas que dispongan para identificar la especie de la micobacteria con métodos comerciales o caseros, realizar estudios de sensibilidad frente a fármacos de primera y/o de segunda línea, detectar micobacterias directamente de la muestra clínica mediante técnicas moleculares y realizar estudios de epidemiología molecular. Cada laboratorio oferta las pruebas diagnósticas en función de sus limitaciones logísticas, de la experiencia de su personal para realizarlas y del coste-eficacia de las mismas en su medio. Solo si la prueba está justificada se debería implantar en el laboratorio, ya que, si no hay evidencia suficiente para avalar el gasto que supone introducir una técnica nueva, se deberían enviar las muestras susceptibles de ser estudiadas a un laboratorio de referencia. El paquete de pruebas básico que han de incluir estos laboratorios cuenta con la tinción de micobacterias, el cultivo, la identificación de los aislamientos mediante técnicas comerciales y la realización de estudios de sensibilidad a fármacos de primera línea de *M. tuberculosis* utilizando técnicas comerciales. El objetivo es obtener resultados fiables y correctos que faciliten el manejo de los pacientes (36).

PARTE EXPERIMENTAL

1 Objetivos

Este trabajo ha tenido como objetivo principal analizar la rentabilidad de las técnicas de amplificación genética en el diagnóstico de la tuberculosis en nuestro medio hospitalario, tomando como patrón de referencia tanto el diagnóstico clínico de la enfermedad como el cultivo.

Como objetivos secundarios se han propuesto los siguientes:

1. Revisión bibliográfica de la literatura publicada sobre técnicas diagnósticas para la tuberculosis.
2. Análisis de las técnicas aplicadas al volumen de muestras clínicas recibidas por el laboratorio de Microbiología, durante un periodo de tiempo, para el diagnóstico de *M. tuberculosis*
3. Rentabilidad de la tinción en el diagnóstico de tuberculosis, tomando como referencia el resultado del cultivo y del diagnóstico clínico.
4. Rentabilidad del cultivo tomando como referencia el diagnóstico clínico.

2 La Sección de Micobacterias del HUMV

Para la realización de este trabajo se ha empleado la infraestructura y los recursos disponibles en la Sección (Unidad) de Micobacterias del Servicio de Microbiología, encargado de recibir, tratar y diagnosticar a las muestras incluidas en el estudio.

2.1 Infraestructura y dotación

El laboratorio clínico de micobacterias dispone, entre otros, de los siguientes recursos para el diagnóstico de las muestras susceptibles de estar infectadas por micobacterias, incluido *M. tuberculosis*:

- Módulos incubadores BacT/ALERT 3D
- Microscopio de inmunofluorescencia
- Estufas de cultivo 35±2º C (Heraeus)
- Cabina de flujo laminar Telstar Bio-II-A
- Incubador Thermo-block DG-210
- Luminómetro Gen-Probe Leader 501
- Termociclador Real Time, Abi Prism 5700 (Applied Biosystems)
- Sistema de PCR en tiempo Real Anyplex-plus MTB/NTM (Seegene)
- Sistema GeneXpert-MTB/RIF (Cepheid)

2.2 Cartera de servicios

A continuación, enumeramos la batería de pruebas que se llevan a cabo en la Unidad. Es preciso aclarar que no todas las muestras clínicas se someten a todas las pruebas diagnósticas (en función del volante de petición), por lo que sólo aquellas en las que se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen/auramina, PCR y cultivo se incluyeron en nuestro estudio.

2.2.1 A) Diagnóstico de la infección tuberculosa

Método IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*) para la detección de la liberación de interferón gamma por los linfocitos T_{CD4} mediante el método QuantiFERON-TB Gold-Plus In-Tube

Se lleva a cabo en pacientes que han estado en contacto con paciente con tuberculosis activa, pacientes con historia antigua de tuberculosis o con indicios de sospecha clínica, o en aquellos que van a ser sometidos a tratamientos biológicos.

2.2.2 B) Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa y micobacteriosis

Examen microscópico:

La técnica de cribado de las muestras es la tinción de auramina, reservando la tinción de Ziehl-Neelsen para situaciones en las que se requiera una confirmación ante una imagen dudosa.

En nuestro estudio se ha utilizado como criterio de inclusión la aplicación indistinta de cada una de ellas, o la aplicación de ambas, ya que no se sigue este criterio de forma homogénea, sino que se aplica en función de la muestra y el contexto del paciente.

Cultivo de micobacterias en medios líquidos y sólidos:

Se realiza un doble cultivo para confirmar la presencia del *M. tuberculosis* y otras micobacterias. Para ello se siembra la muestra en un medio sólido de Coletsos, y en paralelo un medio de cultivo Bact-Alert MP que se incorpora al Sistema Bact-Alert 3D automatizado. En caso de que la muestra sea de sangre o de médula ósea se emplea el medio BacT/ALERT^R MB (medio líquido exclusivo para estas muestras).

Diagnóstico de *M. tuberculosis* mediante técnicas de amplificación genética

Se emplean los sistemas en tiempo Real: Anyplex-plus MTB/NTM y GeneXpert.

En nuestro estudio se ha considerado la realización de cualquiera de las dos técnicas como prueba de PCR, no habiendo sido posible la distinción entre una y otra para los resultados, lo que hubiera añadido alguna información adicional interesante

Diagnóstico *M. tuberculosis* y otras micobacterias mediante técnicas de hibridación

Se emplea la técnica Accuprobe-MTB complex (Hologic) para la identificación de *M. tuberculosis* en cultivo, por medio de una sonda genética específica.

Aunque no ha sido empleada específicamente en nuestro estudio como criterio de inclusión, la mayor parte de los cultivos positivos se identifican mediante dicha técnica

El diagnóstico e identificación de las micobacterias no tuberculosas se realiza con el Accuprobe-MAV complex (Hologic) para la identificación específica del complejo *M. avium* en cultivo, y la secuenciación del gen *rpoB* en aquellos casos en que la tinción de los cultivos demuestra la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, pero las sondas para *M. tuberculosis* y *M. avium* han sido negativas.

Pruebas de sensibilidad *M. tuberculosis* complex y micobacterias de crecimiento rápido

El laboratorio del Servicio de Microbiología aplica el método de gradiente en tiras de plástico (E-test). Es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antimicrobianos por difusión en medio sólido Middlebrook 7H11. Al no tratarse de un método homologado, de forma paralela se envían las muestras positivas a un Centro Nacional de Referencia para su confirmación

Epidemiología molecular de la tuberculosis

En situaciones que así lo requieran, se llevan a cabo estudios epidemiológicos con las cepas de *M. tuberculosis* aisladas mediante la genotipificación con el método MIRU-VNTR

3 Material y Métodos

3.1 Diseño

Se trata de un estudio transversal retrospectivo realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

3.2 Muestras

Se analizaron las muestras recibidas en el servicio para el diagnóstico de tuberculosis, en el periodo comprendido entre el 2011 y 2016. De un total de 18.750 muestras que se recogieron, se seleccionaron 1.043 en función de estas tres variables, independientemente de su resultado:

- Que la muestra hubiera sido sometida a una tinción de Ziehl-Neelsen y/o auramina.
- Que la muestra hubiera sido sometida a una prueba de amplificación genética (PCR)
- Que se hubiera sembrado un cultivo a partir de la muestra.

3.2.1 Análisis de la muestra

Estratificación de la muestra/ clasificación de los datos

Del total de la muestra (1.043) se realizó una clasificación en función de los resultados obtenidos por las pruebas diagnósticas aplicadas. Se confirmaron 41 casos de tuberculosis. En 13 casos las pruebas de tinción, cultivo y PCR fueron positivas, considerándose este resultado coherente de tuberculosis. En los 28 casos restantes, al no encontrarse una coherencia igual en los resultados obtenidos de las 3 pruebas, se realizó una revisión de las historias clínicas de los pacientes y se confirmó el diagnóstico clínico de tuberculosis (Anexo 1).

A continuación, se muestran los 41 casos de tuberculosis estratificados en función de los resultados de la PCR (prueba de amplificación genética) y su concordancia con los resultados esperados:

TUBERCULOSIS POSITIVOS	PCR (+)	PCR (-)
Tinción (+) / cultivo (+)	13	2
Tinción (-) / cultivo (+)	9	7
Tinción (-) / cultivo (-)	5	0
Tinción (+) / cultivo (-)	2	3
Total	29	12

Tabla 1. Estratificación de las muestras tuberculosis positivas según el resultado de la PCR.

En 13 casos la PCR fue positiva, junto al cultivo y a la tinción, siendo los resultados coherentes con lo esperado. En los 28 casos restantes se observó que no existía ese mismo nivel de coherencia, ya que en 12 casos la prueba de amplificación genética fue negativa y en los 16 restantes, a pesar de ser la PCR positiva, alguna de las otras dos pruebas o ambas a la vez fueron negativas.

En este punto se realizó una revisión completa de las historias clínicas de cada uno de los pacientes para constatar evidencia clínica de enfermedad tuberculosa. Se revisaron los antecedentes personales de cada uno, la historia de posibles contactos, la evidencia de tratamientos antituberculosos previos, la sintomatología que acompañaba al cuadro que presentaba el paciente y las pruebas de imagen realizadas en cada caso.

Atendiendo a dichos criterios clínicos (Anexo 1) y tras revisar sus historias clínicas, se confirmaron los 28 casos de enfermedad tuberculosa. Se consideraron a las 1.002 muestras restantes negativas para la tuberculosis tras analizarlas en busca de incoherencias. Fueron clasificadas de la misma manera que las muestras positivas:

TUBERCULOSIS NEGATIVOS	PCR (+)	PCR (-)
Tinción (+) / cultivo (+)	0	5
Tinción (-) / cultivo (+)	0	4
Tinción (-) / cultivo (-)	0	993
Tinción (+) / cultivo (-)	0	0
Total	0	1002

Tabla 2. Estratificación de las muestras tuberculosis negativas según los resultados de la PCR.

Del total, 993 dieron negativo en las 3 pruebas, clasificándolas como muestras negativas para *M. tuberculosis*. De los 9 restantes, el cultivo fue positivo para micobacterias no tuberculosas, descartándose la tuberculosis y clasificándolas como negativas para *M. tuberculosis*.

3.2.2 Análisis estadístico

Una vez terminado el proceso de recopilación de todos los datos, se trasladó toda la información al paquete informático estadístico SPSS® VERSIÓN 20.0 PARA WINDOWS®. Se realizó el cálculo de la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo, en función de:

1. Efectividad diagnóstica de la tinción y la PCR, tomando como referencia el resultado del cultivo, tal y como se ha llevado a cabo en numerosos estudios.
2. Igual que el punto anterior, pero añadiendo en este caso el resultado del cultivo y tomando como referencia los criterios clínicos establecidos para el diagnóstico de tuberculosis

3. Se realizó un análisis global según el tipo de muestra enviada al laboratorio y el resultado de las pruebas diagnósticas.

4 Resultados y Discusión

En el periodo seleccionado, se obtuvieron un total de 1043 muestras que cumplían con la realización de los tres parámetros (cultivo, PCR y tinción), distribuidas según la procedencia de la siguiente manera: 248 esputos y aspirados traqueales, 200 líquidos cefalorraquídeos, 106 aspirados gastroduodenales, 96 lavados brocoalveolares, 95 biopsias ,91 líquidos pleurales ,76 aspirados bronquiales, 63 válvulas cardiacas, 22 líquidos pericárdicos ,21 abscesos,18 líquidos ascíticos y articulares, 7 lesiones tisulares.

Tras finalizar la revisión de las historias y clasificar a las muestras según los criterios clínicos de enfermedad tuberculosa (anexo 1), se obtuvieron los resultados que figuran en la Tabla 3. Se encontraron en total 41 casos de tuberculosis, lo cual representa un 3,9 % del total de muestras estudiadas.

N.º total de muestras = 1043	
○ TB positivas = 41	
- 13 PCR (+) coherentes ^a	
- 16 PCR (+) no coherentes ^b	
- 12 PCR (-) no coherentes ^b	
○ TB negativas = 1002	
- 993 PCR (-) coherentes ^c	
- 9 PCR (-) no coherentes ^d	

Tabla 3. Tabla de resultados globales.

^a Los otros dos parámetros, también positivos

^b Alguno de los otros dos parámetros, negativo

^c Los otros dos parámetros, también negativos

^d Con crecimiento de MNTB

El siguiente paso fue hacer un análisis más exhaustivo de los resultados obtenidos. Se hicieron dos análisis independientes. En el primero se compararon los resultados de la tinción y la PCR con el resultado obtenido por el cultivo, utilizando este último como *gold standard*, tal y como está descrito en la mayor parte de la literatura (Tablas 4 y 5). Además, en éste primer análisis se compararon también los resultados de la PCR, estratificados por tinción, con el resultado del cultivo (Tablas 6 y 7).

Resultado de la tinción	Resultado del cultivo		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	15	10	25
Negativo	16	1002	1018
Total	31	1012	1043

Tabla 4. Comparación de los resultados de la tinción en relación al cultivo.

Sensibilidad = 48,4%

Especificidad = 99,0%

Valor predictivo positivo = 60%

Valor predictivo negativo = 98,4%

La sensibilidad de la tinción para diagnosticar tuberculosis fue de un 48,4% y la especificidad de un 99%. Así, la tinción fue positiva en un 48,4% de los casos de tuberculosis y negativa en un 99% de las muestras. Esto expresa que un $100 - 48,4\% = 51,6\%$ de los pacientes que efectivamente tenían tuberculosis tenían tinción negativa. Claramente ello indica la necesidad de utilizar otros marcadores más sensibles, como por ejemplo la PCR, para poder establecer el diagnóstico de forma más precisa.

Como se puede observar, los resultados coinciden con los datos aportados por la literatura revisada en este estudio **(10)**. La microscopia es una herramienta rápida y con pocos requerimientos técnicos, pero la sensibilidad es muy limitada, por lo que la evidencia que aporta para el diagnóstico de la tuberculosis es insuficiente por si sola.

Aun así, sigue estando justificada como herramienta diagnóstica de primera línea ya que nos orienta en nuestra población estudio en la mitad de los diagnósticos, aunque para completar el despistaje de tuberculosis habrá que hacer en paralelo cultivos de la muestra y en determinados casos, la PCR.

Resultado de la PCR	Resultado del cultivo		
	Positivo	Negativo	Total
Positiva	22	7	29
Negativa	9	1005	1014
Total	31	1012	1043

Tabla 5. Comparación de los resultados de la PCR en relación al cultivo.

Sensibilidad = 71%

Especificidad = 99,3%

Valor predictivo positivo = 75,9%

Valor predictivo negativo = 99,1%

La sensibilidad de la PCR para diagnosticar tuberculosis fue de un 71% y la especificidad de un 99,3%. Así, la PCR fue positiva en un 71% de los casos de tuberculosis y negativa en el 99% de las muestras. Esto indica que un $100-71\%=29\%$ de los pacientes que indudablemente tenían tuberculosis eran PCR negativa.

Comparándolo con la otra prueba diagnóstica, la sensibilidad y el valor predictivo positivo son mayores que en la tinción. Estos datos están en concordancia con lo recopilado en la bibliografía (17) y que hemos dejado plasmado en la sección de métodos moleculares. A pesar de ello, estos resultados no permiten decir que la PCR sea una técnica muy sensible en sí misma para dar un diagnóstico definitivo de tuberculosis, como sabemos una prueba muy sensible (cercana al 99%) es adecuada en aquellos casos en los que el no diagnosticar la enfermedad puede resultar fatal para los enfermos, como ocurre con enfermedades graves pero tratables, como es el caso la tuberculosis.

Sin embargo, el alto valor predictivo negativo (99,1%) muestra la utilidad de la PCR para descartar la infección, lo cual puede ser de particular importancia en pacientes inmunodeprimidos, en donantes de órganos y en instituciones en los que el contagio podría ser un problema de salud pública (centros escolares, prisiones, asilos, etc)

Por otro lado, si estratificamos nuestros resultados de la PCR según la tinción (Tablas 6 Y 7) observamos que la sensibilidad de la PCR aumenta cuando la tinción es positiva, como cabría esperar ya que la carga bacteriana es mayor de 10^4 bacilos en este tipo de muestras, y disminuye ostensiblemente cuando la tinción es negativa.

Destacamos los 9 casos de cultivo positivo en los que la PCR fue negativa, de los que 8 fueron muestras invasivas (BAS, BAL y adenopatías). Podríamos hipotetizar que debido a que estas muestras son de baja carga bacteriana quizás no fueron detectadas por este motivo. Por tanto, no debemos olvidar que en nuestro medio es necesario sembrar cultivos a partir de la muestra para poder aumentar el rendimiento diagnóstico de la tuberculosis.

Resultado de la PCR	Resultado del cultivo		
	Positivo	Negativo	Total
Positiva	13	2	15
Negativa	2	8	10
Total	15	10	25

Tabla 6. Comparación de los resultados de la PCR de las muestras con tinción positiva en relación al cultivo.

Sensibilidad = 86,7%

Especificidad = 80%

Resultado de la PCR	Resultado del cultivo		
	Positivo	Negativo	Total
Positiva	9	5	14
Negativa	7	997	1004
Total	16	1002	1018

Tabla 7. Comparación de los resultados de la PCR de las muestras con tinción negativa en relación al cultivo.

Sensibilidad = 56,3%

Especificidad = 99,5%

En un segundo análisis se compararon, por separado, los resultados de la tinción, la PCR y el cultivo con el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa, según el criterio clínico que se ha utilizado para clasificar las muestras de los pacientes estudiados (anexo 1) (Tablas 8, 9 y 10).

Resultado de la tinción	Criterios clínicos		
	TBC +	TBC-	Total
Positiva	20	5	25
Negativa	21	997	1018
Total	41	1002	1043

Tabla 8. Resultados de la tinción de las muestras de los pacientes según criterios clínicos.

Sensibilidad = 48,8%

Especificidad = 99,5%

Valor predictivo positivo = 80%

Valor predictivo negativo = 97,9%

Aun con las limitaciones de nuestro estudio, se ha podido corroborar que los datos obtenidos coinciden con los resultados hallados en el análisis previo en relación a la sensibilidad. Sin embargo, el valor predictivo positivo aumenta considerablemente, dato destacable en relación al análisis previo.

Resultado de la PCR	Criterios clínicos		
	TBC +	TBC-	Total
Positiva	29	-	29
Negativa	12	1002	1014
Total	41	1002	1043

Tabla 9. Resultados de la PCR de las muestras de los pacientes según criterios clínicos.

Sensibilidad = 70,7%

Especificidad = 100%

Valor predictivo positivo = 100%

Valor predictivo negativo = 98,8%

En este caso los datos también coinciden con los encontrados en el análisis anterior. Destacar el alto valor predictivo positivo, los 29 pacientes con PCR positiva presentaban la enfermedad. Sin embargo, la sensibilidad sigue siendo baja. La evidencia encontrada no justifica aplicar la PCR de forma sistemática sobre las muestras clínicas. Es una herramienta muy útil, pero no garantiza todos los diagnósticos. Lo más adecuado sería justificar su uso en función del contexto clínico del paciente y el resultado preliminar de la tinción, ya que es la manera más eficiente y rentable. Por otro lado, reafirma el alto valor predictivo negativo (98,8%) igualmente que en el primer análisis (99,1%) a la hora de descartar la infección.

Resultado del cultivo	criterios clínicos		
	TBC+	TBC-	Total
Positivo	31	-	31
Negativo	10	1002	1012
Total	41	1002	1043

Tabla 10. Resultados del cultivo de las muestras de los pacientes según criterios clínicos.

Sensibilidad = 75,6%

Especificidad = 100%

Valor predictivo positivo = 100%

Valor predictivo negativo = 99%

Como era de esperar, el cultivo ha demostrado ser la técnica más sensible en el diagnóstico de la tuberculosis, destacando que todavía no hay una técnica que le haya desbancado como *gold standar*.

Por último, si analizamos los resultados de la PCR según la muestra solicitada (Tabla 9) destacamos que de las 29 positivas 17 eran invasivas y de éstas 5 fueron tinción negativa siendo tres de ellas de indudable valor diagnóstico: un LCR, un LP y un pericárdico. Pero al mismo tiempo llama la atención que fueron 524 las muestras invasivas analizadas y con resultado negativo en los tres parámetros.

Tabla 11. Resultados de la tinción, cultivo y PCR en todas las muestras, según su origen															
Pruebas diagnósticas			Muestras												
Tinción	Cultivo	PCR	ESP	LCR	AG	BAL	BI	LP	BAS	VC	LC	AB	LE	ST	TOTAL
+	+	+	4 ^a	0	0	2	2	0	2	0	0	3	0	0	13
-	+	+	4	1	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	9
+	-	+	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
-	-	+	3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5
+	+	-	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
-	+	-	0	0	0	2	2	0	3	0	0	0	0	0	7
+	-	-	1 2 ^b	0	1	1 1	1	0	1	0	0	0	0	0	3 5
-	-	-	230 2	199	104	87 1	89	90	67 1	63	21	18	18	7	993 4
TOTAL			248	200	106	96	95	91	76	63	22	21	18	7	1043

Tabla 11. Resultados de la tinción, cultivo y PCR en todas las muestras, según su origen.

RCP: reacción en cadena de la polimerasa, ESP: esputo, LCR: líquido cefalorraquídeo, AG: aspirado gastroduodenal, BAL: lavado broncoalveolar, BI: biopsia, LP: líquido pleural, BAS: aspirado bronquial, VC: válvula cardiaca, LC: líquido pericárdico, AB: absceso, LE: líquido pericárdico, LE: líquido peritoneal y articular, ST: secreción de lesiones tisulares.

^a En **rojo** las muestras catalogadas como enfermedad tuberculosa, según criterios clínicos

^b En **azul** las muestras con cultivo positivo MNTB

Ahora bien, hay que tener en cuenta el volumen de muestras que fueron negativas en el estudio. Ante esta situación, se nos plantean varias cuestiones:

- La primera es si la petición diagnóstica que se realiza en nuestro medio responde a una alta sospecha de tuberculosis o es parte de un protocolo de diagnóstico diferencial de diferentes patologías
- En segundo lugar, nos preguntamos si la preanalítica, abarcando tanto la calidad y el envío de las muestras como su procesamiento en el laboratorio, se realiza de forma precisa o podemos mejorarla

- En tercer lugar, si estos pacientes presentaban o no realmente la enfermedad, ya que en estos casos no se llevó a cabo la revisión de las historias clínicas.

5 Conclusiones y comentarios finales

En función de los resultados del estudio llevado a cabo en nuestra selección de muestras, podemos concluir que:

- La PCR para el diagnóstico de tuberculosis tiene una eficacia limitada (sensibilidad 70%), la cual mejora cuando se realiza en muestras con baciloscopia positiva (sensibilidad 86,7%).
- La PCR tiene un alto valor predictivo negativo (99,1%), siendo una herramienta muy útil para descartar la enfermedad.
- El cultivo es la técnica diagnóstica más sensible cuando el *gold standar* es el criterio clínico (75.6%).
- La tinción se muestra como una herramienta diagnóstica muy limitada (sensibilidad 48.4%).

A pesar de estos datos, creemos que implantar de forma sistemática la realización de una tinción sobre toda muestra sospechosa de tuberculosis, es razonable debido a la sencillez de la prueba. Pero también, en función de los datos, que en ese mismo volumen de pruebas se realice de forma sistemática una técnica de PCR resultaría excesivo, tanto en coste como en trabajo empleado. Por lo tanto, creemos que la manera más eficiente de utilizar esta prueba sería aplicando simultáneamente criterios clínicos y microbiológicos.

Por ello, a raíz de la realización de este TFG, el servicio de Microbiología está valorando en la actualidad la aplicación de un algoritmo diagnóstico basándose en distintas situaciones clínicas de partida ante un diagnóstico de sospecha fundada de tuberculosis:

- En el caso de que la situación clínica del paciente sea grave se iniciará el diagnóstico de tuberculosis de forma urgente y aplicando las tres pruebas de forma paralela: la tinción, la PCR en el formato de GeneXpert (por el tiempo de respuesta) y el cultivo de la muestra.
- Si el paciente requiere hospitalización y tiene sospecha de enfermedad tuberculosa, de cualquier localización, se deberían realizar los tres tests diagnósticos de forma secuencial, comenzando con el cultivo y la tinción. Si esta última es positiva se realizará un GeneXpert, con lo que podríamos establecer, de forma rápida, un diagnóstico del complejo MTB y, además, su sensibilidad a la rifampicina. En el caso de tinción negativa se realizaría una PCR convencional.
- En los casos de sospecha de tuberculosis pulmonar en pacientes que no requieran hospitalización, se solicitarán tres cultivos seriados a los que se les realizará una tinción, y solo se realizará la PCR si la tinción es positiva, para confirmar si estamos ante un proceso tuberculoso o no.

6 Limitaciones del estudio

Entre las limitaciones del estudio cabe mencionar dos:

1. Se recibieron 18.750 muestras en nuestro laboratorio durante el periodo estudiado y estudiamos solo las que se realizaron las tres pruebas, por tanto, no sabemos el comportamiento de la PCR en un número significativo de muestras (94.44 %) pudiendo variar el resultado de la sensibilidad real de nuestras PCR si se hubiera analizado el resultado de la misma sobre este porcentaje de muestras.
2. No poseemos el dato de cuantas PCRs se realizaron con GeneXpert y cuantas con la PCR convencional dato interesante para estratificar y analizar el rendimiento de nuestras PCRs.

7 Anexo 1

Criterios clínicos para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

Como hemos mencionado en el manuscrito, para la confirmación de los casos de tuberculosis que no resultaron coherentes con las pruebas diagnósticas se revisó la historia clínica de cada caso ateniendo a los puntos que aquí se recogen.

Definiciones

Se siguieron las recomendaciones de la OMS, el CDC (*Centers of Disease Control and Prevention*) y el Instituto de Salud Carlos III.

Un caso de tuberculosis clínicamente diagnosticado es aquel que no cumple con los criterios para la confirmación bacteriológica, pero ha sido diagnosticado con tuberculosis activa por un médico u otro practicante médico, quien ha decidido dar al paciente un ciclo completo de tratamiento de tuberculosis. Para ello se ha de apoyar en síntomas y signos específicos tanto clínicos como radiológicos.

Se consideró caso de tuberculosis a todo paciente que cumpla los dos criterios siguientes:

- Presencia de signos o síntomas compatibles con enfermedad tuberculosa, de cualquier localización, cuando no hay evidencia de otra enfermedad que los explique y se ha llevado a cabo una evaluación diagnóstica completa.
- Prescripción de tratamiento antituberculoso estándar, habitualmente con tres o más fármacos.

Tuberculosis pulmonar se refiere a cualquier caso bacteriológicamente confirmado o clínicamente diagnosticado de tuberculosis, que implica el parénquima pulmonar o el árbol traqueo bronquial. Se incluirá bajo este epígrafe la tuberculosis laríngea en razón de su importancia epidemiológica y para agrupar las tuberculosis transmisibles por vía respiratoria. La tuberculosis miliar se clasifica como tuberculosis pulmonar debido a la presencia de lesiones en el parénquima pulmonar.

Las linfadenopatías tuberculosas intratorácicas (mediastínicas y / o hiliares) o derrame pleural tuberculoso, sin alteraciones radiológicas en los pulmones, constituye un caso de tuberculosis extrapulmonar. Un paciente con tuberculosis respiratoria y extrapulmonar debe clasificarse como un caso de tuberculosis respiratoria.

La tuberculosis extrapulmonar se refiere a cualquier caso bacteriológicamente confirmado o clínicamente diagnosticado de tuberculosis que involucra otros órganos que no sean los pulmones, por ejemplo, pleura, ganglios linfáticos, abdomen, tracto genitourinario, piel, articulaciones, huesos y meninges.

Síntomas y signos clínicos de tuberculosis:

- Tos persistente > 14 días.
- Fiebre de origen desconocido no explicable por otras causas.
- Pérdida o no ganancia de peso en los últimos 6 meses.
- Hemoptisis.
- Diaforesis nocturna.
- Hiporexia o anorexia.
- Astenia.
- Pérdida de la capacidad funcional habitual.
- Presencia de adenopatías.

Síntomas y signos clínicos radiológicos de tuberculosis tanto en radiografía de tórax como en TAC torácico:

Los hallazgos en la radiografía y la TC torácicas, aunque inespecíficos, son un fiel reflejo de las alteraciones estructurales del pulmón y del resto del tórax, lo que permite sospechar la existencia de tuberculosis. Los patrones radiológicos se corresponden con la patogenia de la enfermedad y el predominio en cada momento de la inmunidad celular o de la hipersensibilidad retardada.

Los hallazgos radiológicos fundamentales relacionados con la tuberculosis primaria, aislados o combinados, son:

- **Infiltrados u opacidades parenquimatosas:** corresponden al foco neumónico inicial, segmentario de pequeño tamaño y en ocasiones lobar, que en el niño y adolescente se acompaña de adenopatías.
- **Adenopatías:** sobre todo paratraqueales e hiliares, de preferencia en el hemitórax derecho donde suele localizarse el foco inicial; en el niño son la base del diagnóstico.
- **Atelectasia segmentaria:** por compresión ganglionar de la luz bronquial o por TB endobronquial, sobre todo en el lóbulo medio, condicionando bronquiectasias.
- **Derrame pleural:** que suele ser unilateral; es más frecuente en jóvenes y puede ser el único hallazgo radiológico.
- **Tuberculosis miliar:** es poco frecuente; corresponde a una diseminación hematogena inicial autolimitada.

Los hallazgos radiológicos fundamentales de la tuberculosis de reactivación, secundaria o postprimaria son:

- **Condensaciones** de tipo bronconeumónico, parcheadas sin broncograma aéreo, de localización preferente en segmentos posteriores de lóbulos superiores.
- **Cavitación**, única o múltiple, de diversos tamaños, con o sin nivel hidroaéreo; se suele localizar en segmentos posteriores de los lóbulos superiores;
- **Tuberculomas**: nódulos o masas pseudotumorales de diverso tamaño, con calcificaciones.
- **Fibrosis**: corresponde al intento de curación de infiltrados y cavidades mediante calcificación y retracción fibrosa del segmento o lóbulo afectado, con distorsión de su estructura. Origina bronquiectasias y puede llegar al patrón de pulmón destruido.

Historia de tratamiento previo

- Pacientes nuevos: nunca han sido tratados por tuberculosis.
- Pacientes previamente tratados: han recibido durante 1 mes o más de terapia antituberculosa plena en algún momento de su vida.

Estatus	Definición
Curado	Paciente con tuberculosis con bacteriología confirmada al inicio del tratamiento y que tiene baciloscopia o cultivo negativo en el último mes de tratamiento y al menos en una ocasión anterior.
Tratamiento completo	Paciente con tuberculosis que completó el tratamiento sin evidencia de fracaso, pero sin constancia que muestre que la baciloscopia o el cultivo de esputo del último mes de tratamiento y al menos en una ocasión anterior fueron negativos, ya sea porque las pruebas no se hicieron, o porque los resultados no estén disponibles
Fracaso al tratamiento	Paciente con tuberculosis cuya baciloscopia o cultivo de esputo es positivo en el mes 5 o posterior durante el tratamiento.
Fallecido	Paciente con tuberculosis que muere por cualquier razón antes de comenzar o durante el curso del tratamiento.
Pérdida en el seguimiento	Paciente con tuberculosis que no inició tratamiento o interrumpió el tratamiento durante 2 meses consecutivos o más
No evaluado	Paciente con tuberculosis que no se le ha asignado el resultado de tratamiento.
Tratamiento Exitoso	La suma de pacientes curados y que hayan hecho un tratamiento completo

Tabla 12. Clasificación de pacientes tuberculosos en función del tratamiento.

Se clasificó a los pacientes en función de si habían recibido tratamiento o no, anotando las características del mismo en función de su historia clínica, ya que las referencias al mismo no eran homogéneas ni constantes y no se hizo una clasificación más detallada.

Antecedentes epidemiológicos

En este apartado se recogieron todos los casos de contacto que fueron documentados y todos los pacientes que se tenían pruebas de Mantoux o Determinación de liberación de interferón gamma (QuantiFERON TB®).

Otros diagnósticos y antecedentes personales

Se recogieron todas las referencias encontradas procesos patológicos graves que pudieran haber comprometido la vida del paciente o su estado inmunológico, pero no se pudo sistematizar debido a que la recogida de datos no fue homogénea.

8 Bibliografía

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Ginebra; 2016.
2. González-Martin J. Microbiología de la tuberculosis. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología. 2014;15(1):25-33.
3. Parrish N, Carroll K. Role of the Clinical Mycobacteriology Laboratory in Diagnosis and Management of Tuberculosis in Low-Prevalence Settings. Journal of Clinical Microbiology. 2010;49(3):772-776.
4. GHO | By category | Incidence - Data by World Bank income groups [Internet]. Apps.who.int. 2017 [cited 2 March 2017]. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.57038ALL?lang=en>.
5. GHO | By category | Mortality - Data by World Bank income groups [Internet]. Apps.who.int. 2017 [cited 2 March 2017]. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.57018ALL?lang=en>.
6. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2014. Madrid, 2015.
7. Tuberculosis [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [cited 28 March 2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
8. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2007;30.
9. CDC | TB | Datos básicos sobre la tuberculosis | Cómo se transmite la tuberculosis [Internet]. Cdc.gov. 2017 [cited 8 March 2017]. Available from: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/howtbspreads.htm>
10. Parsons L, Somoskovi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan C, Abimiku A et al. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. Clinical Microbiology Reviews. 2011;24(2):314-350.
11. CDC | TB | Datos básicos sobre la tuberculosis | Infección de tuberculosis latente y enfermedad de tuberculosis [Internet]. Cdc.gov. 2017 [cited 8 March 2017]. Available from: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/tbinfectiondisease.htm>
12. Chegou N, Hoek K, Kriel M, Warren R, Victor T, Walzl G. Tuberculosis assays: past, present and future. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2011;9(4):457-469.

13. Myneedu V, Arora J, Kumar G, Verma A, Bhalla M, Sarin R. Utility of MPT64 antigen detection for rapid confirmation of mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2015;7(2):66.
14. Yam W. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55(5):529-536.
15. Domínguez J, Blanco S, Lacoma A, García-Sierra N, Prat C, Ausina V. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008;26:33-41.
16. Lefmann M, Schweickert B, Buchholz P, Gobel U, Ulrichs T, Seiler P et al. Evaluation of Peptide Nucleic Acid-Fluorescence In Situ Hybridization for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria in Clinical Specimens and Tissue Sections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(10):3760-3767.
17. Neonakis I, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos D. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;75(1):1-11.
18. Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis [Internet]. Cdc.gov. 2017 [cited 20 April 2017]. Available from:
<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5801a3.htm>
19. Alcaide F. ¿Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis?.
20. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009;27(9):493-495.
21. Lewinsohn D, Leonard M, LoBue P, Cohn D, Daley C, Desmond E et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;64(2):e1-e33.
22. Boehme C, Nabeta P, Hillemann D, Nicol M, Shenai S, Krapp F et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(11):1005-1015.
23. Roadmap for rolling out Xpert MTB/RIF for rapid diagnosis of TB and MDR-TB [Internet]. 1st ed. Ginebra; 2010 [cited 8 May 2017]. Available from:
http://www.who.int/tb/laboratory/roadmap_xpert_mtb-rif.pdf
24. Lawn S, Zumla A. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using the Xpert[®]MTB/RIF assay. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2012;10(6):631-635.
25. Sohn H, Aero A, Menzies D, Behr M, Schwartzman K, Alvarez G et al. Xpert MTB/RIF Testing in a Low Tuberculosis Incidence, High-Resource Setting: Limitations in Accuracy and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;58(7):970-976.
26. Muñoz L, Moure R, Porta N, Gonzalez L, Guerra R, Alcaide F et al. GeneXpert[®] for smear-negative pulmonary tuberculosis: does it play a role in low-burden countries? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;75(3):325-326.

27. Alcaide F, Esteban J, González-Martin J, Palacios J. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016;.
28. Zar H, Udawadia Z. Advances in tuberculosis 2011–2012. *Thorax*. 2013;68(3):283-287.
29. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed Res Int*. 2014; 2014:645802
30. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31:406-9.
31. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003;349:1149-56.
32. Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:1347-9.
33. Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll JJ, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Lung Dis*. 2001;5:216-9.
34. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*. 2001;39: 3563-71.
35. Ruiz M, Rodríguez JC, Rodríguez-Valera F, Royo G. Amplified fragment length polymorphism as a complement to IS16110 restriction fragment length polymorphism analysis for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41: 4820-2.
36. CDC | TB | Hojas informativas - Pruebas de tuberculosis [Internet]. Cdc.gov. 2017 [cited 21 April 2017]. Available from: https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/testing/skintesting_es.htm
37. Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Coordinador: Alcaide F. Editores: Cercenado E, Cantón R. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. 2005.

9 Agradecimientos

Quisiera dar las gracias por el atento seguimiento, supervisión y evaluación que ha realizado mi director el Dr. Jesús Agüero Balbín. Gracias a su tutorización he conseguido encontrar la motivación suficiente para sacar el trabajo adelante. También quisiera agradecer el esfuerzo y la atención que me ha dedicado mi subdirectora la Dra. Inmaculada Pérez del Molino para poder llevar a cabo este trabajo.