

Valoración de la prueba de amplificación MTD-2 para la detección directa de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra

Evaluation of the MTD-2 test for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in specimens

I. Dorronsoro, A. Navascués, C. Gastesi, Y. Salicio, M. Ojer, A. Ruz

RESUMEN

Fundamento. Valorar la rentabilidad de la prueba *Amplified Mycobacterium Tuberculosis DirecVt Test* (MTD-2, Gen-Probe) en el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis.

Métodos. Se valoraron los resultados obtenidos con la prueba MTD-2 realizada en 146 muestras, junto con los del cultivo y baciloscopia. MTD-2 se realizó en todas las muestras con baciloscopia positiva (n=47) y en muestras con baciloscopia negativa, si había sido solicitada por el clínico (n=19); además, se testaron una serie de muestras seleccionadas en el laboratorio en base a los datos clínicos y a la calidad de la muestra (n=80). Se consideraron casos de tuberculosis aquellos en los que se aisló *Mycobacterium tuberculosis* y los que fueron tratados como tales.

Resultados. Los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la MTD-2 fueron: 95, 76, 71 y 96%. Para el cultivo: 84, 100, 100, y 90% y para la baciloscopia: 75, 94, 89 y 86% respectivamente. En las muestras con baciloscopia positiva, MTD-2 mostró una alta especificidad, diferenciando las que correspondían a *M. tuberculosis* de las debidas a otras micobacterias. En las muestras con baciloscopia negativa, la sensibilidad no alcanzó los niveles deseados y se obtuvo un bajo valor predictivo positivo.

Conclusiones. MTD-2 ha demostrado ser de gran utilidad en muestras con baciloscopia positiva pues en pocas horas permite diagnosticar una tuberculosis o excluirla. Sin embargo, no nos parece recomendable su empleo en el diagnóstico rutinario de la tuberculosis, debido a su bajo valor predictivo positivo. Por esto, siempre que sea positiva en una muestra con baciloscopia negativa, éste resultado debe ser confirmado con otra muestra.

Palabras clave. Tuberculosis. Diagnóstico. MTD-2.

ABSTRACT

Background. To evaluate the utility of the *Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test* (MTD-2, Gen-Probe) in the microbiological diagnosis of tuberculosis.

Methods. We evaluated the results obtained in 146 specimens with the MTD-2 test, together with those of the culture and smears. The MTD-2 test was performed on all the smear positive specimens (n=47), on the smear-negative specimens, when the test was demanded (n=19), and in other smear-negative specimens previously selected, according to the clinical history of the patient (n=80). We considered real cases of tuberculosis, those that were culture positive for *Mycobacterium tuberculosis* and those that were specifically treated.

Results. The overall sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for the MTD test were: 95, 76, 71, and 96%, for the culture; and 84, 100, 100 and 90% and 75, 94, 89 and 86% for the smears, respectively. In smear positive specimens, the test showed a great specificity, and differentiated *M. tuberculosis* from other mycobacteria. In the smear negatives, the sensitivity of the test was low and so was the positive predictive value, especially in series performed with a high work load.

Conclusions. Data from our study show that the MTD-2 test is a reliable method for rapid diagnosis of tuberculosis in smear positive specimens. However, due to its low sensitivity and positive predictive value, it is not recommended in the routine diagnosis of tuberculosis. Also, for this reason, whenever a positive result is obtained with a smear negative specimen, the result needs to be confirmed with another specimen.

Key words. Tuberculosis. Diagnosis. MTD-2.

An. Sist. Sanit. Navar. 2005; 28 (3): 351-356.

Servicio de Microbiología. Hospital de Navarra. Pamplona.

Aceptado para su publicación el 10 de junio de 2005.

Correspondencia:

Inés Dorronsoro Ibero
Servicio de Microbiología
Hospital de Navarra
C/ Irunlarrea, 3
31008 Pamplona
Tfno. 848 422245

E-mail: ines.dorronsoro.ibero@cfnavarra.es

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis, basado en la demostración directa de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras clínicas y su aislamiento, presenta por una parte el problema de la escasa sensibilidad de las tinciones directas y por otra la lentitud de los cultivos. La presentación clínica anodina de muchos procesos tuberculosos, unida a la necesidad de realizar un diagnóstico rápido de la enfermedad con el fin de evitar contagios, explican la necesidad de emplear pruebas diagnósticas más rápidas, sensibles y específicas. Por estas razones, la posibilidad de utilizar técnicas de amplificación genómica directamente sobre las muestras, se ha presentado como algo muy atractivo en los laboratorios de micobacterias¹⁻⁴. Una de las principales dificultades que presentan las técnicas moleculares, cuando se quieren emplear rutinariamente, es su elevado coste^{5,6} unido a su sensibilidad (especialmente en muestras con baciloscopias negativas, que se ha considerado lejos de lo deseable^{7,8}) y la posibilidad de contaminaciones entre las muestras por la presencia de amplicones, lo que puede suponer un problema adicional al de la contaminación cruzada en el procesamiento, por lo que el laboratorio está obligado a mantener un riguroso control de los procesamientos¹⁰⁻¹².

En el presente trabajo hemos valorado en nuestro laboratorio la utilidad de la aplicación de la técnica molecular *Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test* (MTD-2, Gen-Probe, San Diego, CA) en el diagnóstico rutinario de la tuberculosis, y sus resultados se han comparado con los obtenidos mediante la baciloscopia y los del cultivo de las muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras

Entre julio de 2002 y diciembre de 2003 se realizó la prueba de amplificación MTD-2 en 146 muestras (128 respiratorias y 18 no respiratorias) correspondientes a 136 pacientes. En ese período de tiempo se procesaron 4.625 muestras para cultivo de micobacterias, obteniéndose 128 cultivos

positivos para *M. tuberculosis* que correspondían a 70 pacientes. La prueba de MTD-2 se realizó siempre que se obtuvo una baciloscopia positiva (47 muestras) y/o siempre que el clínico la solicitó expresamente (19 muestras).

Hasta mayo de 2003, con el fin de obtener un mayor rendimiento al kit de MTD-2 (dada su caducidad de 2 meses una vez reconstituidos los reactivos), el día en que se realizaba la prueba junto con las muestras problema se incluían además una serie de muestras con baciloscopia negativa, que previamente habían sido seleccionadas como más sospechosas, tras valorar los datos que figuraban en la petición (sospecha seria, origen, edad, historia familiar) y la calidad de la muestra. Las muestras hasta ese momento se guardaban congeladas a -20°C. El número de muestras en este grupo fue de 80.

A partir de mayo de 2003, de acuerdo con bibliografía consultada¹³, tanto las alícuotas del reactivo de hibridación como las de la mezcla enzimática de amplificación se guardaron a -70°C, con lo que su período de caducidad se puede prolongar hasta 6 meses. Desde entonces, únicamente se ha realizado la prueba en las muestras con baciloscopia positiva y/o en el caso de que lo pida expresamente el clínico.

La decontaminación/concentración se realizó con N-acetil-L-cisteína-NaOH y centrifugación a 3.000 x g.

Las preparaciones microscópicas concentradas se tiñeron con auramina-rodamina. Las positivas, se confirmaron mediante la tinción de Ziehl-Neelsen.

Se realizó la prueba de amplificación genómica siguiendo en todo momento las indicaciones de la casa productora, con la modificación descrita para la conservación de los reactivos. Se consideraron positivas aquellas determinaciones cuyo "Relative Lights Units (RLU)" fue superior o igual a 30.000. Los controles positivos se prepararon a partir de un cultivo de *M. tuberculosis* diluido como indica el protocolo de Gen-Probe. Cuando solamente se realiza una prueba, el control positivo se añade a una alícuota de la muestra que se

va a testar, con lo cual conseguimos además un control de amplificación

Se realizaron cultivos en el medio BACTEC 12B (sistema de lectura BACTEC 460TB de Becton Dickinson, Maryland USA) y en medio de Löwenstein-Jensen. Una vez detectado crecimiento, se realizaron extensiones que se tiñeron mediante el método de Ziehl-Neelsen y si procedía se realizó la identificación mediante sondas genéticas (*Gen-Probe Inc.*, San Diego, CA.) o pruebas bioquímicas convencionales.

Se revisaron todas las historias clínicas de los pacientes con un resultado positivo.

Se consideraron como casos de tuberculosis aquellos en los que el cultivo resultó positivo a *M. tuberculosis* y los que fueron considerados clínicamente y tratados como tales.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las 146 pruebas estudiadas se exponen en la tabla 1. Se observa que la MTD-2 resultó positiva en 75 y negativa en 71.

De las 75 que resultaron positivas, tras el estudio de las historias clínicas, se valoraron como verdaderas positivas 53, y en 22 ocasiones los resultados fueron falsos positivos. En 47 ocasiones se aisló *M. tuberculosis* de modo que en 6 casos diagnosticados de tuberculosis el único resultado positivo fue el de la MTD. Uno era un líquido cefalorraquídeo con celularidad y parámetros bioquímicos compatibles con una tuberculosis, que evolucionó favorablemente tras recibir tratamiento específico. Otro se trataba de una muestra de esputo que pertenecía a un paciente con una tuberculosis ganglionar, con cultivo y baci-

loscopia de ganglio positivos, pero negativos los de las muestras de esputo, por lo que el resultado de la MTD se consideró como verdadero positivo. Las restantes 4 muestras positivas correspondían a 3 pacientes con historias clínicas anodinas, y en los que se inició el tratamiento por el resultado de la MTD, sin que tengamos más datos para valorar si se trataban realmente de casos de tuberculosis. Finalmente, en 22 ocasiones como hemos dicho, los resultados fueron considerados falsos positivos ya que se excluyó la posibilidad de una tuberculosis, tras el estudio de las historias clínicas y la evolución de los pacientes.

De las 71 ocasiones en que la MTD resultó negativa, en 3 se aisló *M. tuberculosis* en cultivo (falsos negativos). En otras 5 ocasiones, los cultivos resultaron positivos aislándose micobacterias distintas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, las baciloscopias en 4 de ellos habían sido positivas, por lo que el resultado negativo de la MTD sirvió para discriminar el diagnóstico. Finalmente, el número de resultados verdaderos negativos fue de 68.

La valoración global de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba de MTD fue respectivamente: 95, 76, 71, y 96%. Los mismos parámetros para el cultivo fueron: 84, 100, 100 y 90% y para las baciloscopias: 75, 94, 89 y 86%.

DISCUSIÓN

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis se ve limitado por la lentitud del cultivo y la falta de sensibilidad de la baciloscopia. El desarrollo de procedimientos de cultivo en medios líquidos, con

Tabla 1. Resultados de la prueba MTD, cultivo y baciloscopia en los casos de tuberculosis.

	MTD		CULTIVO		BACILOSCOPIA		TOTAL
	Positiva	Negativa	Positivo	Negativo	Positiva	Negativa	
TBC Sí	53	3	47	9	42	14	56
TBC No	22	68	5*	85	5	85	90
TOTAL	75	71	52	94	47	99	146

* Micobacterias distintas de *M. tuberculosis*.

sistemas sensibles de detección y el empleo de sondas genéticas en la identificación, han supuesto un gran avance ya que han acortado en un promedio de 10 días el tiempo mínimo de 3 semanas que requerían los cultivos en medio sólido de Löwenstein-Jensen, o similares, para llegar al diagnóstico. Al mismo tiempo, se ha incrementado la sensibilidad del cultivo y de momento éste es imprescindible para poder realizar un estudio posterior de sensibilidad.

La posibilidad de realizar un diagnóstico mediante técnicas de amplificación genómica el mismo día en que se reciben las muestras, sigue suponiendo un reto para el microbiólogo clínico. Su aplicación a la rutina del laboratorio debe, sin embargo, ser sometida a un análisis crítico debido por una parte a su elevado coste, y por otra, a sus problemas de sensibilidad y especificidad. La interpretación de los resultados no siempre es fácil, y en muchos casos, requiere el estudio de nuevas muestras^{5,13,14}.

En nuestro laboratorio, los valores de sensibilidad y especificidad respectivamente para la MTD han sido de 95 y 76%. Estos resultados varían ampliamente entre los distintos autores^{7,8,15,16} que además pueden emplear estrategias diversas para resolver las discrepancias entre los resultados de la MTD y el cultivo. Así por ejemplo, hay autores que elevan el rango de lectura de 30.000 RLU, definido por el proveedor como límite de lectura positiva, a otros rangos más elevados con lo que consiguen aumentar la especificidad^{15,17,18}. Sin embargo, en nuestra experiencia esta aproximación no ha resultado fiable ya que se han obtenido resultados falsos positivos con lecturas altas de RLU y verdaderos positivos con lecturas por debajo de los 500.000 RLU, límite propuesto por algunos de estos autores.

La sensibilidad de la prueba también varía entre los distintos autores. La FDA (*Food and Drugs Administration*) aprobó en un principio dos pruebas de amplificación para el estudio de muestras respiratorias con baciloscopias positivas: la MTD (*Gen Probe*) y la *Amplicor Mycobacterium tuberculosis* Test (Roche). La FDA llegó a esta

conclusión sobre la base de los resultados de los estudios iniciales que demostraron la baja sensibilidad y especificidad de estas pruebas⁹. Sin embargo, la nueva versión MTD-2 aumenta la sensibilidad y es recomendada en muestras respiratorias y de otro tipo^{14,19}.

El precio de estas pruebas, si se las pretende utilizar indiscriminadamente, supone un problema importante en los laboratorios de diagnóstico^{5,6}, pero quizás sea más grave su pobre valor predictivo positivo como ha sido constatado por diversos autores^{19,20}.

La caducidad del kit, una vez reconstituidos los reactivos, es de dos meses si se conservan el reactivo de hibridación y la mezcla de amplificación a -20°C. Por este motivo en nuestro laboratorio, para obtener un mayor rendimiento del kit, cada vez que se realizaba la prueba ante una muestra con baciloscopia positiva, o porque había sido solicitada expresamente, se incluían un promedio de 10 a 15 muestras, seleccionadas previamente por el resumen de historia clínica que figuraba en la hoja de petición y la calidad de la muestra. La mayoría de los resultados falsos positivos los obtuvimos cuando se realizaba la prueba con este número elevado de muestras.

A partir de mayo de 2003, tras consultar el trabajo de Vlaspolder y col¹³ conservamos los reactivos de hibridación y amplificación a -70°C, con lo cual hemos podido prolongar su viabilidad hasta los 6 meses, un tiempo con el que obtenemos el máximo rendimiento ya que con un mínimo de 2 kits al año, con la incidencia actual de la tuberculosis en nuestra zona, cubrimos la demanda de la prueba limitando su utilización a las muestras en que la baciloscopia fue positiva y aquellas en que se solicita expresamente.

En resumen, teniendo en cuenta nuestros resultados, concluimos que la prueba es útil y su gasto está justificado, si se limita su uso a las muestras con baciloscopias positivas, ya que comprobando que la muestra no contiene inhibidores, lo que podemos conseguir colocando una concentración de *M. tuberculosis* -tal como recomienda el proveedor para el control positivo en otra alícuota de la muestra pro-

blema-, podemos afirmar o descartar el diagnóstico de una tuberculosis en unas horas. La prueba no debe realizarse indiscriminadamente en muestras con baciloscopia negativa, y en estos casos, siempre que obtengamos un resultado positivo, será necesario repetir la prueba con otra muestra para confirmar este resultado.

Si se conservan los reactivos reconstituidos a -70°C, se puede obtener el máximo rendimiento a la prueba y hacer que ésta resulte costo-eficiente.

Finalmente, queremos señalar que otra de las aplicaciones en que ha demostrado la prueba su utilidad es en la identificación de cultivos positivos en medios líquidos, cuando todavía presentan un índice de crecimiento tan bajo, que impide poder realizar con fiabilidad la identificación, mediante la sonda sin amplificación^{21,22}.

BIBLIOGRAFÍA

1. PFYFFER GE. Amplification techniques: hope or illusion in the direct detection of tuberculosis. *Med Microbiol Lett* 1994; 3: 335-347.
2. EISENACH KD, SIFFORD MD, CAVE MD, BATES JH, CRAWFORD JT. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-1163.
3. BRISSON-NOEL A, AZNAR C, CHUREAU C, NGUYEN S, PIERRE C, BARTOLI M et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; 338: 364-366.
4. JONAS V, ALDEN MJ, CURRY JI, KAMISANGO K, KNOTT CA, LANKFORD R et al. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2410-2416.
5. DOERN GV. Diagnostic Mycobacteriology: Where are we today? *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1873-1876.
6. DOWDY DW, MATERS A, PARRISH N, BEYRER C, DORMAN SE. Cost-effectiveness analysis of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 948-953.
7. BODMER T, GURTNER A, SCHOPFER K, MATTER L. Screening of respiratory tract specimens for the presence of Mycobacterium tuberculosis by using the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1483-1487.
8. LA ROCCO MT, WANGER A, OCERA H, MACIAS E. Evaluation of a commercial rRNA amplification assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in processed sputum. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 726-731.
9. CDC. Nucleic acid amplification test for tuberculosis. *MMWR* 1996; 45: 950-951.
10. WELCH K, BROWN G, JONAS V, FERRARO MJ. Performance of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test in a laboratory that infrequently isolates Mycobacterium tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 22: 297-299.
11. PERFECTO B, DORRONSORO I, LÓPEZ-GOÑI I. Confirmación mediante tipificación molecular de contaminaciones cruzadas en el laboratorio de micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 12-15.
12. BURMAN WJ, REVES RR. Review of false-positive cultures for Mycobacterium tuberculosis and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1390-1395.
13. VLASPOLDER F, SINGER P, ROGGEVEEN C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2699-2703.
14. CDC. Notice to readers: Update: Nucleic Acid Amplification Test for Tuberculosis. *MMWR* 2000; 49: 593-594.
15. ALCALÁ L, RUIZ-SERRANO MJ, HERNANGOMEZ S, MARÍN M, GARCÍA DE VIEDMA D, SAN JUAN R et al. Evaluation of the upgraded amplified Mycobacterium tuberculosis direct test (gen-probe) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41: 51-56.
16. GAMBOA F, FERNÁNDEZ G, PADILLA E, MANTEROLA JM, LONCA J, CARDONA PJ et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 684-689.
17. O'SULLIVAN CE, MILLER DR, SCHNEIDER PS, ROBERTS GD. Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1723-1727.

18. PFYFFER GE, KISSLING P, JAHN EM, WELSCHER HM, SALFINGER M, WEBER R. Diagnostic performance of Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 834-841.
19. WOODS GL. Molecular methods in the detection and identification of Mycobacterial infections. *Arch Path Lab Med* 1999; 123: 1002-1006.
20. ARTILES F, PENA MJ, CAMPOS-HERRERO MI, LAFARGA B. Valoración clínica de la prueba Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct 2. (AMTD-2, GenProbe) en el diagnóstico rápido de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 53-56.
21. ZHENG X, PANG M, ENGLER HD, TANAKA S, REPPUN T. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in contaminated BACTEC 12B broth cultures by testing with Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3718-3720.
22. DESMOND EP, LORETZ K. Use of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test for early detection of Mycobacterium tuberculosis in BACTEC 12B medium. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1993-1995.