

---

## **Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en nuestras clínicas realizada con dos técnicas de amplificación: Gen-Probe y PCR (Amplicor)**

### ***Detection of "Mycobacterium tuberculosis" in clinical samples employing two amplification techniques: Gen-Probe and PCR (Amplicor)***

A. Rosino, L. Torraba, V. Martínez de Artola, M. Gutiérrez

---

#### **INTRODUCCIÓN**

El diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis (TBC) se realiza habitualmente mediante la visualización de los bacilos ácido-alcohol resistentes de las muestras sometidas a una tinción y mediante el cultivo de las mismas en medios adecuados. El método del cultivo presenta una alta sensibilidad y especificidad, requiriéndose ocho semanas de incubación para poder obtener un resultado definitivo<sup>1,2</sup>.

Últimamente se ha desarrollado un método de cultivo radiométrico (BACTEC), con el cual se puede obtener un resultado en aproximadamente 13 días<sup>3</sup>; sin embargo la utilización de esta metodología presenta el inconveniente de la manipulación de material radioactivo.

Las técnicas de amplificación genómica que presentan una alta sensibilidad y especificidad, así como rapidez en su realización, constituyen una alternativa diagnóstica de las pruebas tradicionalmente

utilizadas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Numerosos investigadores han detectado secuencias específicas de *Mycobacterium tuberculosis* y de otras micobacterias atípicas<sup>4</sup> mediante una técnica de amplificación llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) realizada en muestras clínicas de distintas procedencias, como son muestras respiratorias<sup>5-14</sup>, líquido cefaloraquídeo<sup>12,15,16</sup> y hemocultivos<sup>12,17</sup>. Recientemente se ha desarrollado un nuevo método de amplificación comercializado por Gen-Probe para la detección directa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*<sup>18,20</sup>.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la sensibilidad y especificidad de la técnica Amplicor, del método de amplificación de Gen-Probe, del cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y de la baciloscopia con tinción de auramina, con respecto a la tipificación del cultivo con sondas específicas.

---

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 113-117.

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Virgen del Camino. Pamplona.

**Correspondencia:**  
Aurora Rosino Rodríguez  
C/ Tajonar nº 8, 2ªA  
31006 Pamplona  
Tfno. 948 241424  
Fax 948 241424

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se procesaron 50 muestras (12 broncoaspirados, 33 esputos, 2 abscesos, 1 orina, 1 hemocultivo y 1 médula ósea) recibidas entre diciembre de 1993 y noviembre de 1994, para la detección y búsqueda de *Mycobacterium tuberculosis* y de otras micobacterias atípicas.

Las muestras fueron sometidas a un proceso de descontaminación-concentración según la técnica de Tacquet y Tison<sup>21</sup>. Se concentraron mediante centrifugación a 3000xg durante 15 minutos y el sedimento se resuspendió con 2 ml de tampón fosfato. Se utilizó un mililitro de esta suspensión en la preparación de extensiones para ser teñidas con auramina y en la inoculación en tubos de Löwenstein-Jensen. La muestra se consideraba negativa si al cabo de ocho semanas de incubación no se observaba crecimiento. En caso contrario se procedía a su tipificación mediante la utilización de sondas específicas para *Mycobacterium tuberculosis*. El resto del sedimento en suspensión se utilizó para las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, almacenándolo a 4°C si las determinaciones eran realizadas antes de una semana desde la recepción de la muestra, y a -20°C cuando su procesamiento excedía a este tiempo.

### Detección de r-RNA del *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica Gen-Probe (Amplified *Mycobacterium* test)

La técnica se realizó siguiendo las especificaciones de la casa comercial según el procedimiento que se explica a continuación. En un tubo con 200 µL de tampón de lisis se añadían 15 µL del producto de descontaminación-concentración, y se sonicaba durante 15 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaban en un tubo 25 µL del reactivo de amplificación reconstituido, 200 µL de aceite y 50 µL del lisado añadiéndolo por debajo de la capa de aceite. Los tubos se incubaron a 95°C durante 15 minutos y a 42°C durante 5 minutos. Después se añadían 25 µL de la mezcla enzimática y se incubaba a 42°C durante 2 horas. Por último se echaba a cada tubo 20 µL de reactivo

de terminación y se sometía a 42°C durante 10 minutos. Una vez finalizada esta incubación se vertían 100 µL de la sonda reconstituida y se dejaban 15 minutos a 60°C. Seguidamente en cada tubo se añadían 300 µL de reactivo de selección y se mantenían durante 5 minutos a 60°C para que se efectuara la hidrólisis del ester de acridina de la sonda que no había sido hibridada. Se enfriaban los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leían por luminiscencia. En cada experimento se incluían un control positivo y otro negativo, así como los controles de hibridación positivo y negativo.

### Detección del DNA de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR (Amplicolor)

La técnica se realizó según las especificaciones de la casa comercial siguiendo el procedimiento que se explica a continuación. Se añadían 100 µL del producto de descontaminación-concentración a 500 µL de solución de lavado y se realizó la mezcla mediante vortex, después se centrifugaron 10 minutos a 12500 x g y se aspiró el sobrenadante. Posteriormente se añadió 100 µL de reactivo de lisis que se mezcló mediante vortex y se incubó durante 45 minutos a 60°C, se centrifugaron las muestras 5 segundos y se vertieron 100 µL de reactivo de lisis y se mezcló mediante vortex. Una vez realizados estos pasos se procedió a la amplificación utilizando la mezcla de la llamada "master mix" (mezcla de reactivos que contiene Amplitaq<sup>®</sup> (Taq polimerasa), dNTPs y los cebadores biotilados) y la Amperasa<sup>®</sup> (uracil-N-glicosilasa).

Las muestras se sometieron en un termociclador a un ciclo térmico a 50°C durante 2 minutos; 2 ciclos a 98°C durante 20 segundos, 62°C durante 20 segundos y 72°C durante 45 segundos; 35 ciclos a 94°C durante 20 segundos, 62°C durante 20 segundos y 72°C durante 45 segundos; 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. Las muestras se mantuvieron a 72°C hasta su desnaturalización.

Los productos de amplificación una vez desnaturalizados en medio alcalino, se hibridaron con una sonda específica,

dirigida frente a la región amplificada, que se encuentra fijada en los pocillos de la placa microtiter. Posteriormente se adicionó avidina conjugada con peroxidasa y un cromógeno que actúa como sustrato. Se leyó la absorbancia de las muestras a 450 nm, considerándose positivas las que presentaban una densidad óptica superior a 0,350. En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1. Los 17 cultivos positivos fueron tipificados con sondas específicas como *Mycobacterium tuberculosis*. De 3 muestras en las que el cultivo fue positivo, en 2 de ellas el Amplicor fue negativo y en una la técnica de Gen-Probe fue también negativa.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos con las técnicas de amplificación (Amplicor y Gen-Probe).

	Baciloscopia		Cultivo	
	+	-	+	-
<b>Amplicor</b>				
+	9	6	15	-
-	2	33	2	33
<b>Gen-Probe</b>				
+	11	5	16	-
-	-	34	1	33

La especificidad encontrada fue del 100% en todos los métodos ensayados, y la sensibilidad fue del 100% para el cultivo, 94,1% para el método de Gen-Probe, 88,2% para el de Amplicor y del 64,7% para la baciloscopia.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el método de Gen-Probe son similares a los de otros investigadores como Jonas y col.<sup>19</sup> que obtienen una sensibilidad del 82% y una especificidad del 99%, Miller y col.<sup>18</sup> que encuentran una sensibilidad del 91% y una

especificidad del 98,5% o Bodmer y col.<sup>20</sup> que observan una sensibilidad del 71,4% y una especificidad del 99%. Otros autores que realizan la amplificación del DNA por PCR de una forma no estandarizada ni comercializada, muestran sensibilidades que varían según los investigadores entre el 55% y el 100% y especificidades entre el 62,6% y el 100%.<sup>7,9,11,13,14</sup> Con la técnica Amplicor la sensibilidad obtenida es superior a la encontrada por algunos de estos autores<sup>9,14</sup>, aunque es inferior a la que refieren Cousins y col.<sup>7</sup>, Pao y col.<sup>11</sup> y Altamiro y col.<sup>13</sup>; la especificidad es del 100% al igual que la hallada por Altamiro y col.<sup>13</sup> y Soini y col.<sup>14</sup>.

A la vista de los resultados hemos observado que la sensibilidad es algo superior con el método de Gen-Probe que con el Amplicor de Roche. La baciloscopia tiene una sensibilidad inferior a estas técnicas.

Hay que añadir que tanto el análisis de Gen-Probe como el Amplicor se pueden realizar en aproximadamente 5 horas. Por todo ello creemos que las técnicas de amplificación aportan un método diagnóstico rápido para su utilización en el laboratorio, con una sensibilidad superior a la encontrada para la baciloscopia.

Aunque estas dos técnicas de amplificación genómica son una herramienta importante para el diagnóstico de la tuberculosis, ya que aportan una alta sensibilidad y especificidad así como rapidez en la obtención de resultados, creemos que se deben seguir utilizando los métodos habituales conjuntamente con ellas, debido a que hasta el momento no existen sondas específicas para la detección de otras micobacterias atípicas que pueden ser patógenas. El uso exclusivo de las técnicas de amplificación genómica no podría establecer el diagnóstico de estas distintas micobacterias.

La aplicación de estas nuevas metodologías supone una mejora asistencial importante para el paciente con enfermedad tuberculosa a la vez que constituye un mecanismo muy eficaz para impedir la diseminación, y como consecuencia la

transmisión del bacilo de Koch a la población general.

### BIBLIOGRAFÍA

1. BATES JH. Diagnosis of tuberculosis. Chest 1979; 76 (Suppl): 757-63.
2. BATES JH, BRENNAN PJ, DOUGLAS GW et al. Improvements in the diagnosis of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1986; 134 (Suppl 2): 415-423.
3. MIDDLEBROOK G, REGGIARDO Z, TIGERIT WD. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. Am Rev Respir Dis 1977; 115: 1066-1069.
4. COOK SM, BARTOS RE, PIERSON CL, FRANK TS. Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol 1994; 3: 53-58.
5. BRISSON NA, GICQUEL B, LECOSSIER D, LEVY-FREBAULT V, NASSIF X, HANCE AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; ii: 1069-1071.
6. BUCK GE, O'HARA LC, SUMMERSGILL JT. Rapid simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 1331-1334.
7. COUSINS DV, WILTON SD, FRANCIS BR, GOW BL. Use of the polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 1992; 30: 255-258.
8. NOLTE FS, METCHOCK B, MCGOWAN JE, EDWARDS A, OKWUMABUA O, THURMOND C et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridation. J Clin Microbiol 1993; 31: 1777-1782.
9. SHAWAR RM, EL ZAATARI FAK, NATARAJ A, CLARRIDGE JE. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridation methods. J Clin Microbiol 1993; 31: 61-65.
10. HERMANS PW, SCHUITEMA AR, VAN SOOLINGEN D, VERSTYNNEN CP, BICHK EM, THOLE JE et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1990; 28: 1204-1213.
11. PAO CC, YEN TSB, YOU JB, MAA JS, FISS EH, CHANG CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol 1990; 28: 1877-1880.
12. KOLK AH, SCHUITEMA AR, KULPER S, VAN LEEUWEN J, HERMANS PW, VAN EMBDEN JD et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. J Clin Microbiol 1992; 30: 2567-2575.
13. ALTAMIRO M, KELLY MT, WONG A, BESSUILLE ET, BLACK WA, SMITH JA. Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* in clinical samples by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 2173-2176.
14. SOINI H, SKURNIK M, LIIPPO K, TALA E, VILJANEN MK. Detection and identification of Mycobacteria by amplification of a segment of the Gene coding for the 32-Kilodalton protein. J Clin Microbiol 1992; 30: 2025-2028.
15. LEE BW, TAN JA, WONG SC, TAN CB, YAP HK, LOW PS et al. DNA amplification by the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparison of protocols involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65 kDa antigen, and MB B64. J Neurol Sciences 1994; 123: 173-179.
16. LIU PYF, SHI ZY, LAU YJ, HU BS. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by a simplified nested amplification protocol. Neurology 1994; 44: 1161-1164.
17. SCHLUGER NW, CONDOS R, LEWIS S, ROM WN. Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. Lancet 1994; 344: 232-233.
18. MILLER N, HERNÁNDEZ SG, CLEARY TJ. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol 1994; 32: 393-397.
19. 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 r-RNA. J Clin Microbiol 1993; 31: 2410-2416.

DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN MUESTRAS...

20. BODMER T, GURTNER A, SHOPPER 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.
21. TACQUET A, TISON F. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl-sulfate de sodium. Ann Inst Pasteur (Paris) 1961; 100: 676-680.