

## **Panorama actual de la Tuberculosis y su Diagnóstico**

Robledo, Jaime. MD, PhD

Corporación para Investigaciones Biológicas

Universidad Pontificia Bolivariana

### **Resumen:**

La tuberculosis permanece como la enfermedad transmisible que ocasiona más muertes al año alrededor del mundo. Las dificultades para su control se potencian con la coexistencia del SIDA, la farmacorresistencia y la falta de acceso a servicios de salud. Recientemente, el diagnóstico de la enfermedad ha pasado de métodos basados en microscopía y cultivos a métodos moleculares. Estos muestran un desempeño cercano a los de los métodos estándar, pero proporcionan resultados más rápidos. La OMS tiene recomendaciones particulares para el uso de estas tecnologías, como son Xpert, “line probe assay” y LAMP (Loop mediated isothermal amplification). En diversas etapas de desarrollo se encuentran tecnologías adicionales, la mayoría de ellas basadas en métodos moleculares, por lo que es probable que en el futuro se encuentren más alternativas para mejorar el diagnóstico de tuberculosis. Desarrollos más recientes están relacionados con los métodos basados en secuenciación total de los genomas con tecnologías de nueva generación. Estas tecnologías aplicadas en tuberculosis permiten en un solo análisis la identificación de *M. tuberculosis* u otras especies, la determinación de la resistencia a fármacos basada en la detección de mutaciones y la genotipificación. Aunque el costo de estas tecnologías es más elevado que los métodos estándar, el reto que se plantea es como utilizarlas en un contexto de costo utilidad y efectividad, para que el acceso a ellas no sea una barrera para las poblaciones que más las necesitan.

### **Abstract:**

Tuberculosis remains the infectious disease that causes the highest death toll around the world. Problems related to HIV infections, drug resistance and lack of

access to health care compromise the future control of the disease. Recently, the laboratory diagnosis of the disease has been transformed from microscopy and culture based on molecular methods. These have shown an accuracy close to standard methods with the added advantage to give more rapid results. Based on this, WHO have issued policies for the use of those that have been already endorsed by WHO, are Xpert-TB Rif, line probe assay (LIPA) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Several additional methods, most based in molecular technologies, are in different development stages that envisioned a future with more alternatives for tuberculosis diagnosis. More recently, whole genome sequencing (WGS) based on new generation technologies has been applied to tuberculosis. WGS allows at the same time to identify Mycobacterium tuberculosis or other mycobacterial species, detection of resistance to anti-tuberculous drugs and genotyping. The challenge for the future use of newer technologies in tuberculosis diagnosis, is not only to improve the way the disease is diagnosed, but to eliminate the barriers that the cost of these technologies possesses to the patient's access in more need of them.

**Palabras claves:** diagnóstico de tuberculosis, métodos moleculares para diagnóstico de tuberculosis, Xpert-TB Rif, LIPA, LAMP, métodos de nueva generación de secuenciación en tuberculosis

La tuberculosis sigue siendo una enfermedad prevalente en el mundo y es la enfermedad infecciosa a la que se le atribuyen más muertes por año, aproximadamente 1'500.000 <sup>1</sup>. Las restricciones económicas, la coexistencia de la pandemia del SIDA, la falta de acceso a servicios de salud y el aumento de las formas farmacorresistentes de la enfermedad son todos factores que mantienen la prevalencia de esta y disminuyan la probabilidad de su erradicación para el 2030, como lo ha planteado la ONU en sus Objetivos de Desarrollo sostenible<sup>2</sup>.

### **Métodos fenotípicos de diagnóstico<sup>3</sup>**

El diagnóstico es uno de los pilares sobre los que se basa el control de la tuberculosis. Tradicionalmente se ha hecho con métodos fenotípicos como son:

- **la microscopía**, con coloración Ziehl-Neelsen o de fluorescencia con auramina-rodamina demuestra el bacilo tuberculoso en las muestras clínicas obtenidas de los pacientes. Se considera que tiene una sensibilidad baja, se necesitan 10.000 bacilos por mL para tener una baciloscopia de esputo con positividad de una cruz. A pesar de la baja sensibilidad, es un método de bajo costo, que requiere poca tecnología, por lo tanto es realizable en los primeros niveles de atención y proporciona resultados rápidos, en menos de 24 horas.
- **Los cultivos**, son el método de referencia por su sensibilidad pues pueden detectar desde 10 bacilos en una muestra, se pueden hacer en medios sólidos o líquidos siendo estos últimos más sensibles y proporcionar resultados más rápidos. Aún así, los cultivos son más costosos de realizar, necesitan al menos un laboratorio de mediana complejidad y los resultados más rápidos se obtienen en 10 a 15 días si se utilizan los cultivos líquidos.
- **Pruebas de susceptibilidad a medicamentos**, se realizan para medicamentos de primera y segunda línea con base en cultivos sólidos o líquidos. Estos últimos son los más utilizados por su estandarización y mayor rapidez en proporcionar resultados. Son indispensables para definir la farmacorresistencia bien sea la multirresistencia o TB.-MDR, resistencia a isoniazida y rifampicina, como la polirresistencia a otros medicamentos o como resistencia extendida o TB-XDR, esta última TB-MDR más resistencia a medicamentos de segunda línea como fluoroquinolonas y un medicamento inyectable. Por su complejidad y necesidad de personal experto, estas pruebas se realizan en laboratorios de referencia y pueden tardar 2 a 6 semanas en proporcionar un resultado.

## **Métodos moleculares de diagnóstico**

Los métodos diagnósticos basadas en tecnologías moleculares ya son de uso corriente para el diagnóstico de tuberculosis y han cambiado el panorama diagnóstico de esta enfermedad de una manera importante. Al menos tres pruebas han sido avaladas por la Organización Mundial de la Salud para diagnóstico de tuberculosis, el Xpert MTB-Rif, el Genotype y la prueba de Lamp (“loop amplification”)<sup>4</sup>.

La prueba comercial Genotype está basada en tecnología denominada LIPA (“Line probe assay”) que utiliza pcr convencional para amplificar los fragmentos blancos que se hibridizan en una membrana para detectar los productos amplificados, bien sea ADN de *Mycobacterium tuberculosis* o ADN con mutaciones que indican resistencia a rifampicina, isoniazida, y en otra de sus presentaciones a medicamentos de segunda línea como fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Con esta tecnología se obtienen resultados en 24 a 48 horas y requiere de un laboratorio con áreas separadas para evitar la contaminación. La OMS recomienda su uso en muestras con baciloscopia positiva para confirmación de *M. tuberculosis* o su utilización a partir de cultivos o como reemplazo de pruebas de susceptibilidad fenotípicas a rifampicina e isoniazida<sup>5</sup>.

El Xpert MTB-Rif utiliza tecnología molecular de PCR en tiempo real y hace detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y al mismo tiempo detecta el ADN de las mutaciones más frecuentes relacionadas con resistencia a rifampicina. Todas las reacciones las realiza en un cartucho cerrado donde se inocular la muestra del paciente, este se pone en un instrumento que se encarga de interpretar las señales, proporcionando resultados aproximadamente en dos horas. Su sensibilidad es mayor que los de la microscopía, pero menor que la del cultivo. Puede realizarse en niveles de atención primarios donde solo se realice la microscopia, pues no requiere de un laboratorio especializado con bioseguridad para manejo de tuberculosis, aunque si necesita un suministro de electricidad de

buena calidad y mantenimientos periódicos que pueden ser costosos<sup>6</sup>. La OMS recomienda realizar esta prueba para diagnóstico inicial de meningitis, para diagnóstico inicial en pacientes con VIH o sospecha de TB-MDR<sup>5</sup>.

La prueba de LAMP (“loop mediated amplification”) es una prueba que realiza amplificación de ADN blanco en forma isotérmica, esto es que no requiere los cambios de temperatura necesarios en una amplificación por pcr convencional. Por esta razón no requiere instrumentos costosos para realizarla y se adapta como prueba a los niveles primarios de atención<sup>7,8</sup>. La OMS recomienda que puede ser usada como reemplazo de la microscopía para diagnóstico de tuberculosis pulmonar en adultos y como diagnóstico adicional a la microscopía cuando esta es negativa<sup>5</sup>.

En resumen las pruebas moleculares descritas pueden ser utilizadas en niveles primarios de atención donde se realice microscopía, mejorando la sensibilidad de la microscopía y proporcionando resultados rápidos, lo cual incluye en el caso de Xpert la determinación de la susceptibilidad a la rifampicina, para los segundos niveles o laboratorios especializados estarían en capacidad de realizar las pruebas tipo LIPA para determinar la sensibilidad a rifampicina e isoniazida y confirmar el aislamiento de *M. tuberculosis* obtenido por cultivo en medios sólidos. En el tercer nivel de atención correspondiente a laboratorios de referencia o al laboratorio nacional de referencia se realizan todos los tipos de cultivo en medio sólido o líquido, microscopía, pruebas de susceptibilidad a medicamentos de primera y segunda línea por métodos fenotípicos y las pruebas moleculares no solo de diagnóstico, sino también de susceptibilidad a primera y segunda línea<sup>9</sup>.

De acuerdo con la OMS, un algoritmo para la introducción de las pruebas moleculares en el diagnóstico de pacientes con tuberculosis es el siguiente: prueba inicial la microscopía, si es positiva realizar LIPA para confirmar diagnóstico y determinar sensibilidad a isoniazida y rifampicina. Si la microscopía es negativa realizar Xpert. En el caso de que la LIPA y el Xpert sean positivos, realizar cultivos para tener aislamientos y pruebas de susceptibilidad a primera y

segunda línea. La ventaja de este algoritmo es la generación de resultados en 24 horas o menos para definir, si el paciente es negativo, si tiene tuberculosis y si es resistente a isoniazida y rifampicina<sup>9</sup>.

La visión de la OMS, así como de otras agencias multilaterales, ha aumentado el interés por el desarrollo de pruebas que mejoren el diagnóstico de tuberculosis. Además de las pruebas moleculares ya avaladas, se encuentran en desarrollo al menos 10 a 15 pruebas que saldrán al mercado en los próximos años y que posiblemente van a mejorar las ya existentes<sup>5,10</sup>.

Una tecnología relativamente reciente basada en los métodos de secuenciación genómica de nueva generación se ha utilizado también para el diagnóstico de tuberculosis. Con la secuenciación total del genoma utilizando el ADN de *M. tuberculosis* contenido en la muestra del paciente se puede obtener el diagnóstico, la susceptibilidad a todos los medicamentos basada en la identificación de las mutaciones asociadas y además la genotipificación que permite la identificación de aislamientos asociados a brotes epidémicos<sup>11,12</sup>. Esta tecnología tiene la potencialidad de reemplazar todas las demás pruebas, si los costos, la logística y el acceso a ella se adecuan a los programas de control de tuberculosis.

Las nuevas tecnologías moleculares, particularmente las ya avaladas, mejoran el tiempo de respuesta para definir un diagnóstico de tuberculosis y su susceptibilidad a medicamentos como isoniazida y rifampicina. El reto con la adición de estas tecnologías para el diagnóstico de tuberculosis es que su costo, el cual indudablemente es más alto, no constituya una barrera más para el acceso de los pacientes a una mejor forma atención. Si fuera este el caso, estas tecnologías no tendrán el impacto esperado en el control de la tuberculosis.

## Referencias

- 1 Global Tuberculosis Report. 2016).
- 2 Organización de las Naciones Unidas. Objetivos de Desarrollo Sostenible.

ONU. Available at: <http://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/> (2015).

- 3 Hopewell Philip C, Pai Madhukar, Maher Dermot, Uplekar Mukund, Raviglione Mario C. International Standards for Tuberculosis Care. *Lancet Infect Dis* 2006;**6**(11):710–25. Doi: 10.1016/S1473-3099(06)70628-4.
- 4 Pai Madhukar, Behr Marcel A, Dowdy David, Dheda Keertan, Divangahi Maziar, Boehme Catharina C, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Prim* 2016;**2**:16076. Doi: 10.1038/nrdp.2016.76.
- 5 UNitaid. *Diagnostics Technology Landscape 5th Edition, May 2017*. 2017.
- 6 WHO. Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children: Policy Update 2013:97. Doi: ISBN 978 92 4 150633 5.
- 7 Sharma Megha, Sharma Kusum, Sharma Aman, Gupta Nalini, Rajwanshi Arvind. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for speedy diagnosis of tubercular lymphadenitis: The multi-targeted 60-minute approach. *Tuberculosis* 2016;**100**:114–7. Doi: 10.1016/j.tube.2016.07.015.
- 8 Gray Christen M, Katamba Achilles, Narang Pratibha, Giraldo Jorge, Zamudio Carlos, Joloba Moses, et al. Feasibility and Operational Performance of Tuberculosis Detection by Loop-Mediated Isothermal Amplification Platform in Decentralized Settings: Results from a Multicenter Study. *J Clin Microbiol* 2016;**54**(8):1984–91. Doi: 10.1128/JCM.03036-15.
- 9 World Health Organization. Implementing tuberculosis diagnostics: A policy framework 2015:39. Doi: WHO/HTM/TB/2015.11.
- 10 Pai Madhukar, Schito Marco. Tuberculosis Diagnostics in 2015: Landscape, Priorities, Needs, and Prospects n.d. Doi: 10.1093/infdis/jiu803.
- 11 Pankhurst Louise J, Del Ojo Elias Carlos, Votintseva Antonina A, Walker Timothy M, Cole Kevin, Davies Jim, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *Lancet Respir Med* 2016;**4**(1):49–58. Doi: 10.1016/S2213-

2600(15)00466-X.

- 12 Van Soolingen Dick, Jajou Rana, Mulder Arnout, De Neeling Han. Whole genome sequencing as the ultimate tool to diagnose tuberculosis. *Int J Mycobacteriology* 2016;**5**:S60–1. Doi: 10.1016/j.ijmyco.2016.10.036.