

Validación de un test serológico para la tuberculosis pulmonar: estudio multinacional

Magis C (Holanda)

Colaboración del staff médico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y Ambientales “Prof Dr Juan Max Boettner”

Introducción

La Tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más comunes e importantes en el mundo. Cada año se estiman nuevos diagnósticos de 8 millones de casos de y 3 millones de muertes por TB (1). El diagnóstico de la TB aun constituye un desafío y su detección precoz seguido por una apropiada terapia, reduce su morbimortalidad. La Organización Mundial de la Salud considera al desarrollo de nuevas pruebas serológicas como una de las prioridades fundamentales dentro de las investigaciones sobre la tuberculosis. En la tentativa de reemplazar la baciloscopia de muestras de esputo, (2).

El diagnóstico de TB activa radica en la combinación de sospecha clínica más hallazgos radiológicos con subsecuente confirmación laboratorial, que a veces es difícil de conseguir. La baciloscopia (Ziehl Neelsen) del esputo tiene una sensibilidad con un rango de 50-63%, dependiendo de las características laboratoriales a más de la experiencia del personal en realizar el frotis (3). Más aún, una considerable cantidad de casi 10^4 mycobacteria por ml de esputo se requiere para considerarlo positivo.(3,4) Aunque el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* permanece como el patrón oro, lleva mucho tiempo y puede existir contaminación cruzada resultando en diagnóstico falsos-positivos, además que el crecimiento de organismos no micobacterianos puede proporcionar resultados falsos negativos (4). Ambas técnicas necesitan una muestra de esputo representativa. Cuando un paciente no expectora se utilizan la inducción del esputo o directamente la broncoscopia para aumentar el rendimiento diagnóstico aunque estos dos últimos recursos pueden aumentar el riesgo de transmisión nosocomial, especialmente para el trabajador de salud (5,6,7).

La detección del DNA del *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es altamente sensible en especímenes respiratorios (7), pero el alto costo y la necesidad de personal especialmente entrenado, hace imposible la aplicación a gran escala en países en vías de desarrollo. Pese a recolectar muestras de esputo repetitivamente existe un 10-15% de casos de TB en los que será imposible detectar al *Mycobacterium tuberculosis* en el esputo o en el cultivo. En estos casos la respuesta al llamado “tratamiento empírico” puede utilizarse como proceso diagnóstico, asumiendo los riesgos inherentes. In extra pulmonary TB there is almost always need to use invasive diagnostic procedures to obtain material for direct

acid-fast staining and culture of *Mycobacterium tuberculosis*. Esto ultimo es poco recomendable y tecnicas de alta tecnologia no pueden ser realizadas en la practica clínica asumiendo tambien que la tasa de aislamiento del *Mycobacterium tuberculosis* en especimenes no respiratorios es bajo (3, 4).

Considerando lo expuesto y mencionando la falta de un buen test para screening de TB activa en la poblacion vacunada con BCG, es obvio que existe una necesidad gigantesca de una prueba serológica que sobrepase estas dificultades.

El Mycodot™ es una prueba simple, rápida y barata para detectar anticuerpos contra el antígeno lipoarabinomannan (LAM) de la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis*. Esta prueba altamente especifica esta disponible desde 1997 con variables desenlaces en su sensibilidad. En los pacientes HIV-negativos y TB, la sensibilidad del Mycodot varia desde 33% en Tanzania (8), 56% en Ghana (9) y 70,8% en Tailandia(10). Por otro lado, en pacientes HIV positivos y TB, la sensibilidad varia entre 25% en Ghana (9), 40,1% en Tailandia(10) y 62,5% en Guinea-Bissau (11).

Un test fundamentado en inmunoensayo anti IgG anti LAM no disponible comercialmente fue testada en dos poblaciones diferentes en los EEUU y en Canada(12), mostraron que la sensibilidad varia entre 85-93%. En pacientes HIV negativos de Italia se encontro una sensibilidad de 89%(13).

Investigamos la sensibilidad y los potenciales roles adicionales de esta test serologico para detectar anticuerpos contra un componente de la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el Mycodot™ en el proceso diagnostico de TB en un centro de enfermedades pulmonares en la capital de Paraguay. El estudio fue efectuado en un grupo de pacientes con clínica de TB, en cuidadores de salud de la clínica y en un grupo de controles sanos.

Métodos

Población de estudio:

Se reclutaron pacientes internados por el diagnóstico de TB en el Instituto de Nacional de Enfermedades Respiratorias y Ambientales, un centro de enfermedades pulmonares en la capital del Paraguay. Además se reclutó personal de salud del mismo centro y controles sanos en el periodo comprendido entre marzo-febrero 2003. Primeramente: un grupo de casos nuevos, baciloscopia (ZN) positiva, confirmada por PCR de lavado broncoalveolar (BAL) para *Mycobacterium tuberculosis* complex, fue incluido si HIV- y tto antituberculoso < 3 dias. Hemos considerado a los pacientes como inmunocomprometidos si resultaban + p/ HIV, tomaban drogas inmunosupresoras o estaban embarazadas..

También hemos incluido a un grupo de pacientes tratados específicamente por TB por al menos 3 semanas, sin inmunocompromiso y con respuesta parcial si aplicado “tratamiento empírico”, esto es: baciloscopia negativa

Además se incluyó a personal de salud del INERAM, asintomáticos y sin signos de TB activa. Hemos incluido a personas con al menos un año de antigüedad en la institución, con HIV-, y que nunca se trataron con drogas antiTB en el pasado.

Por ultimo, controles sanos sin historia de TB activa y sin familiares o amigos cercanos que estén trabajando en guardias de TB y con test de HIV- fueron incluidos..

La historia clínica, el estado de BCG, PPD, radiografía torácica y muestras heparinizadas de sangre venosa fueron tomadas para los estudios serológicos incluyendo HIV.

Como parte del estudio, el diagnóstico de TB se confirmó mediante RT-PCR del fluido del BAL en el grupo de pacientes “casos nuevos” y en un grupo seleccionado de trabajadores de salud para excluir las muestras que resultaren positivas por RT-

Se centrifugó el plasma y se congeló en alícuotas a -80 grados Celsius hasta que las pruebas se efectuaran en el Laboratorio Regional de Salud Pública en Enschede, Holanda.

Mycodot

El Mycodot™ es un test simple, rápido (20 min) que detecta anticuerpos específicos IgG antimycobacterianos contra el lipoarabinomannan (LAM) en la sangre del paciente antígeno. Cuando los marcadores se incuban en la sangre, suero o plasma, los antígenos específicos anti-LAM, si están presentes, se unen al antígeno. Los nichos son lavados para remover los anticuerpos no específicos y se incuban en una suspensión de partículas coloreadas durante 10 minutos, lo cual marca los anticuerpos unidos al LAM. Si la cantidad de anticuerpos específicos es suficiente en la muestra sérica, una mancha coloreada se formará donde el antígeno se “ancla” al nicho y si no hay suficiente cantidad, la prueba será dudosa. Los fabricantes aconsejan repetir el test dentro de pocos días para obtener un resultado definido. Ocho muestras pueden testarse en un mismo tiempo y en un mismo kit.

Resultados

La población de estudio consistió en 126 personas, 51% hombres, con edad media 43 años (amplitud 18-79 años). Catorce “casos nuevos” de TB (pacientes nuevos), 27 pacientes con TB tratados al menos durante 3

semanas (pacientes tratados), 56 trabajadores de salud, y 29 controles sanos. Las características de la población de estudio se resumen en la tabla 1.

Pacientes “nuevos”

Catorce pacientes con TB activa “casos nuevos” tuvieron confirmación molecular de diagnóstico de TB (RT-PCR) al análisis de fluido de BAL. Cinco tenían lesiones cavitarias, 8 infiltrados en uno o más lóbulos y un paciente tenía derrame pleural a la radiografía torácica.

Once pacientes tuvieron Mycodot positivo (79%) (Tabla 2). Tres pacientes (21%) tuvieron resultado dudoso. Ya que no se había comenzado tratamiento específico en estos casos, lo hemos considerado como negativos para nuestro análisis.

Pacientes tratados.

Veintisiete pacientes tratados, con un lapso promedio de tiempo de tratamiento desde la inclusión de 37 días (rango 21-110 días) Veinte tuvieron Mycodot positivo, 1 dudoso y 6 negativos (Table 1).

Trabajadores de salud

Once trabajadores de salud se sometidos a broncoscopia con BAL y todos ellos fueron negativos para *Mycobacterium tuberculosis complex* en la PCR a “tiempo real” y todos ellos tuvieron Mycodot negativo. (especificidad 100%)

De 45 trabajadores de salud, 43 tenían Mycodot negativo resultando solo dos positivos.

Controles sanos

Todos los 29 controles sanos tuvieron Mycodot™ negativo.

Resultados del Mycodot™ en pacientes y trabajadores de salud sometidos a BAL

Considerando el PCR a tiempo real del *Mycobacterium tuberculosis* en el BAL como el gold standard para el diagnóstico de TB pulmonar, hemos analizado los diagnosticados como casos nuevos y un grupo seleccionado de trabajadores de salud que fueron sometidos a BAL (tabla 2).

De catorce pacientes “casos nuevos” diagnosticados como TB activa, 11 fueron positivos al Mycodot resultando dudoso en 3 pacientes mostrando sensibilidad de 79%. Los trabajadores de salud fueron todos negativos al Mycodot (especificidad 100%). Un resultado positivo tendría un valor predictivo positivo de 100% y un resultado negativo tendría un valor predictivo negativo de 79%.

Discusión

En la población estudiada en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y Ambientales “Prof Dr Juan Max Boettner” de Asunción –Paraguay, la prueba de detección de anticuerpos IgG contra lipoarabinomannan en el suero ha demostrado utilidad para el diagnóstico de TB pulmonar en casos nuevos, así como en pacientes ya tratados.

Aunque el número de pacientes con diagnóstico confirmado por PCR “a tiempo real” de *Mycobacterium tuberculosis complex* fue pequeño, el Mycodot™ tuvo buena sensibilidad y una excelente especificidad, aunque lo más interesante es su valor predictivo positivo. Por otro lado, el valor predictivo negativo fue relativamente baja para esta población, ya que se comprobaron tres pruebas dudosas en el grupo de pacientes “casos nuevos” que hemos considerado negativos para nuestro análisis, lo cual verdaderamente se confirmó al repetir la prueba en concordancia a lo recomendado por los fabricantes, prueba que dio positiva en una segunda oportunidad aunque si bien metodológicamente este gesto nos quito el “blinding”.

La tinción con Ziehl Neelsen en el INERAM alcanza una sensibilidad del 63%, y pese a que existe mucha experiencia y capacidad en la realización del frotis, la sensibilidad del Mycodot fue cercana al 80%. Una sensibilidad superior fue encontrada en varios otros países en vías de desarrollo y torna a este tipo de diagnóstico una posibilidad que necesitamos considerar aplicar a larga escala.

En ocho nuevos casos y con frotis de esputo negativo, cinco fueron positivos con el Mycodot (62,5%), aún después de unas pocas semanas de tratamiento. Este aspecto podría dar un valor adicional en el proceso diagnóstico de la TB. Cuatro de los descritos como frotis negativo durante la internación fueron pacientes que no completaron tratamiento antituberculoso en ocasiones previas, al menos un año antes de la hospitalización. Las recaídas de TB, después de un tratamiento incompleto, es a veces difícil de diagnosticar. Estos pacientes se sienten enfermos por semanas, la mayoría mostrando mismas lesiones en la radiografía, se quejan de peso ligeramente disminuido y tos escasa. Iniciar un nuevo esquema terapéutico para TB activa en estos casos implica considerar otras drogas anti-tuberculosas y probablemente alargar el tratamiento. Especialmente en pacientes demostradamente no adherentes al primer esquema de tratamiento uno necesita estar seguro del diagnóstico. El Mycodot proporcionó resultados positivos en 4 de estos 5 casos. Lo que no sabemos de los anticuerpos circulantes es si estos se tornan negativos después de cierto tiempo de tratamiento con drogas antituberculosas.

Dos trabajadores del INERAM resultaron positivos al test Mycodot. El primero fue un portero que no acudió a su test de PPD y el otro fue un joven cirujano que nunca tomó profilaxis contra *Mycobacterium tuberculosis* pese a ser PPD +

Podemos concluir a partir de datos en los trabajadores de salud que el valor predictivo negativo no es influenciado por el estado de vacunación BCG o un test PPD positivo. De este modo, el Mycodot™ es una herramienta útil para excluir TB activa.

El uso del Mycodot™ es limitado por la prevalencia de Lepra in Paraguay: 11 per 100,000 in 2001(14). Ya que el *Mycobacterium Lepra* tiene el antígeno LAM en la pared celular puede teóricamente causar pruebas falsas positivas.

Además en pacientes HIV+ la sensibilidad del test está alterada debido a una reducida respuesta inmune humoral (10).. En Paraguay, sin embargo, la presencia de HIV no es tan alta como en África o en Asia.

También la posibilidad de reacciones cruzadas con antígenos fúngicos como los de la Paracoccidioidomicosis necesita considerarse, por compartir determinados componentes moleculares con LAM(6) de modo que podría eventualmente producir falsos positivos.

Fuera de lo considerado aquí, sentimos con confianza que el Mycodot™ es útil para detectar y excluir TB pulmonar activa en Paraguay, ya que el valor predictivo positivo ayuda a efectuar un diagnóstico rápido para un tratamiento eficaz incluso en el mismo día de diagnóstico. Hemos evaluado este método en una región endémica y lo testamos en pacientes con baciloscopia de esputo positiva, en controles sanos en vez de pacientes con otras enfermedades pulmonares. El test debe ser evaluado en la población de pacientes que se hospitalizan, incluyendo HIV+, ancianos y niños, en TB pulmonar y extrapulmonar.

Referencias

1. C. Dye, S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, M.C. Raviglione, 1999. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. JAMA; 282: 677-686.
2. World Health Organization/Global Tuberculosis Programme: Product Development Guideline. WHO Tuberculosis Diagnostics workshop. WHO, Cleveland, OH. 1997.

3. K. Siddiqi, M-L Lambert, J. Walley, 2003. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *The Lancet, infectious diseases* vol 3.
4. P.D.O. Davies, 1998. *Clinical Tuberculosis*. Chapter 5 page 69-79.
5. T. McWilliams, A.U. Wells, A.C. Harrison, S. Lindstrom, R.J. Cameron, E. Foskin, 2002. Induced sputum and bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*; 57:1010-1014.
6. M.B. Conde, S.L. Soares, F.C.Q. Mello, V.M. Rezende, L.L.Almeida, A.L. Reingold, C.L. Daley, A.L. Kritski, 2000. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis; *Am J Resp Crit Care Med* 162: 2238-2240.
7. K.Al Zahrani, H.Al Jahdali, L.Poirier, P.Rene, D. Menzies, 2001. Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis; *Int J Tuberc Lung Dis*; 5(9): 855-860.
8. G.R. Somi, R.J. O'Brien, G.S. Mfinanga, Y.A. Ipuge, 1999. Evaluation of the Mycodot test in patients with suspected tuberculosis in a field setting in Tanzania. *Int J Tuberc Lung Dis*; 3 (3): 231-238.
9. S.D. Lawn, E.H. Frimpong, E. Nyarko, 1997. Evaluation of a commercial immunodiagnostic kit incorporating lipoarabinomannan in the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Ghana. *Tropical Medicine and International Health*; vol 2 no 10 pp 978-981.
10. W. Ratanasuwan, J.K. Kreiss, C.M. Nolan, B.A. Schaeffler, 1997. Evaluation of the Mycodot test for the diagnosis of tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Int J Tuberc Lung Dis*; 1 (3): 259-264
11. A. Antunes, J. Nina, S. David, 2002. Serological screening for tuberculosis in the community: an evaluation of the Mycodot procedure in an African population with high HIV-2 prevalence. *Research in Microbiology*; 153: 301-305.
12. E.D. Chan, R. Reves, J.T. Belisle, P.J. Brennan, W.E. Hahn, 2000. Diagnosis of Tuberculosis by a visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. *Am J Respir Crit Care Med*; Vol 161: 1713-1719.
13. R. Del Prete, V. Picca, A. Mosca, M. D'Alagni, G. Miragliotta, 1998. Detection of anti-lipoarabinomannan antibodies for the diagnosis of active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*; 2 (2): 160-163.
14. GIDEON, Global Infectious Diseases and Epidemiology Network, update 24-5-2004.

TABLES

Table 1

Characteristics of study population

	New patients	Treated patients	Health care workers	Healthy controls
Number	14	27	56	29
Sex (M/F)	8/6	17/10	26/30	14/15
Mean age (range)	48 (23-78)	45 (18-72)	43 (21-79)	35 (20-78)
Mean time worked in the sanatorium in years (range)			11,1 (1-53)	
Positive Mycodot™	N = 11	N = 20	N = 2	N = 0
BCG status (yes/no/unknown)	2/8/4	6/16/5	38/13/2	21/7/1
TST in mm (at time of inclusion).				
Group 1 (0-4 mm)	N =	N =	N =	N =
Group 2 (5-9 mm)	2	4	13	10
Group 3 (10-15 mm)	2	1	2	3
Group 4 (>15 mm)	2	1	12	2
Group 5 = missing data	8	16	23	9
	0	5	6	5

Table 2

Mycodot™ test-results in patients and health care workers with BAL.

	RT-PCR +	RT-PCR -
Mycodot +	11	0
Mycodot -	3	11

(Fisher exact test = 0,0001)

Sensitivity of 79%, specificity of 100%.

Positive predictive value 100%, negative predictive value is 79%

Table 3

Mycodot™ test-results in new patients and all health care workers

	New patients	Health care workers
Mycodot +	11	2
Mycodot -	3	54

Sensitivity 79%, specificity 96%

Positive predictive value of positive test result 85%

Negative predictive value of negative test result 95%