

Diagnóstico de la tuberculosis en niños. Evaluación de la técnica reacción en cadena de la polimerasa

C. Muñoz, A. Gené, I. Pérez, A. Mira, J. Roca¹, C. Latorre

Resumen. *Objetivo:* Evaluar la utilidad de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicada al diagnóstico de la enfermedad tuberculosa en población infantil.

Pacientes: Todos los pacientes que acudieron durante el año 1995 al Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona por sospecha o interés en descartar enfermedad tuberculosa. Se consideraron dos tipos de diagnóstico: 1) diagnóstico de evidencia clínica sin confirmación microbiológica, y 2) diagnóstico de certeza con confirmación microbiológica.

Método: Todas las muestras enviadas al laboratorio de microbiología para el estudio de micobacterias fueron procesadas mediante baciloscopia, cultivo y PCR. Para la realización de la PCR se utilizó el test Amplicor PCR *M. tuberculosis*®.

Resultados: Durante el período de estudio se procesaron 64 muestras, la mayoría jugos gástricos, de 41 niños. Se diagnosticaron 14 pacientes de enfermedad tuberculosa con edades comprendidas entre 8 meses y 17 años. La confirmación microbiológica por PCR y/o cultivo se obtuvo en cuatro pacientes (31%). En uno de ellos sólo la PCR fue positiva (tinción y cultivo negativos), existiendo evidencia clínica de enfermedad tuberculosa. Todas las muestras con cultivos positivos a *M. tuberculosis*, de los tres pacientes restantes, fueron positivas por PCR. No detectamos ningún falso positivo en el total de muestras procesadas.

Conclusión: Aun con las limitaciones del diagnóstico microbiológico de la tuberculosis infantil la PCR contribuye a perfeccionar este diagnóstico destacando por su rapidez con posibilidad de entrega de resultados en 9 horas, su sensibilidad, en nuestra serie ligeramente superior al cultivo, y por su especificidad.

An Esp Pediatr 1997;47:353-356.

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa; Tuberculosis; Niños.

at the microbiology laboratory were processed by bacilloscopy, culture and PCR. Amplicor PCR *M. tuberculosis*® was used as the PCR method.

Results: Sixty-four samples (most of them gastric juices) from 41 children were processed during the study period. Fourteen patients, between 8 months and 17 years of age, were diagnosed of tuberculosis. Microbiological confirmation by culture and/or PCR was obtained in four patients (31%). PCR was the only positive technique in one child (staining and culture negative) with clinical evidence of tuberculosis. All samples from the other three patients that had positive cultures also had positive PCR results. False positives were not detected.

Conclusions: PCR improves the diagnosis of pediatric tuberculosis. It stands out because of its quickness (possibility of a 9 hour turn-around time), sensitivity (slightly higher than cultures in our series) and specificity.

Key words: Polymerase chain reaction. Tuberculosis. Child.

DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS IN CHILDREN. EVALUATION OF THE TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION

Abstract. *Objective:* The purpose of this study was to evaluate the usefulness of the technique of polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of tuberculosis in the pediatric population.

Patients and methods: All patients seen at the University Hospital Sant Joan de Déu in Barcelona during the year of 1995 in which there was a clinical suspicion of or an interest in discarding tuberculosis were studied. Two types of diagnoses were considered: 1) Diagnosis from clinical evidence without microbiological confirmation. 2) A certain diagnosis including microbiological confirmation. All samples received

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad curable que lejos de estar erradicada continúa siendo un grave problema de salud pública.

En Cataluña, la incidencia de enfermos se encuentra estabilizada alrededor de 3.000 casos por año, siendo aproximadamente la tercera parte bacilíferos. La elevada tasa de 50 por 100.000 habitantes⁽¹⁾ y la presencia de un elevado número de casos en jóvenes y niños es propia de un país que no tiene controlada la endemia.

La tuberculosis infantil constituye un buen indicador de la situación epidemiológica de esta enfermedad en la comunidad, con alto rendimiento en la investigación de las fuentes de contagio. El diagnóstico precoz en los tres diferentes estadios que presenta la enfermedad (exposición, infección y enfermedad) es crucial para un adecuado control de esta patología.

El diagnóstico de la enfermedad tuberculosa en niños es difícil, debido al escaso rendimiento de las pruebas de laboratorio tradicionales y por la escasez de síntomas e inespecificidad de los mismos⁽²⁾. Los datos clínicos y radiológicos son, en ocasiones, diagnósticos, pero el estudio microbiológico es el que confirma el resultado. Los métodos de diagnóstico microbiológico de la enfermedad tuberculosa adolecen de importantes limitaciones. Tradicionalmente el único método rápido de diagnóstico de las micobacteriosis, usado desde hace 100 años, consistía en la visualización directa de la muestra a través del microscopio. La tinción de Ziehl-Neelsen y la tinción fluorescen-

Servicio de Microbiología y ¹Pediatría. Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona.

Correspondencia: Carmen Muñoz Almagro. Servicio de Microbiología. Hospital Sant Joan de Déu. 08950 Esplugues (Barcelona).

Recibido: Julio 1996

Aceptado: Junio 1997

te de auramina-rodamina eran y son los procedimientos más utilizados, pero presentan una baja sensibilidad⁽³⁾. La confirmación del diagnóstico por cultivo puede retrasarse más de 6 semanas por el lento metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*. Debido a la eliminación intermitente de las micobacterias es necesario procesar más de una muestra para aumentar el rendimiento del cultivo. En la población infantil el cultivo de *M. tuberculosis* presenta una dificultad añadida que le resta sensibilidad: en los niños no es fácil obtener un esputo adecuado por lo que se suele procesar jugo gástrico, muestra que por sus características es poco idónea para la viabilidad de las micobacterias y que suele ser paucibacilar.

Las nuevas técnicas de amplificación genética con su mayor sensibilidad y especificidad⁽⁴⁻⁶⁾ pueden contribuir a solventar estas limitaciones del diagnóstico microbiológico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de estas técnicas. El principio de la PCR es ingenioso y sencillo, consiste en una amplificación «in vitro» de fragmentos específicos de los ácidos nucleicos por copia repetida mediante la enzima ADN polimerasa.

Recientemente se ha introducido en el mercado un sistema comercial, Amplicor TB® (Roche Diagnostic System), que agiliza y facilita la técnica pudiendo tener resultados definitivos en 9 horas⁽⁷⁾. Este sistema amplifica parte del gen 16sRNA de las micobacterias y detecta, mediante una sonda marcada enzimáticamente, una región específica de *M. tuberculosis complex*.

El objetivo del presente estudio es evaluar si la aplicación de la técnica de amplificación genética PCR ha incrementado la sensibilidad, rendimiento y rapidez del diagnóstico de la enfermedad tuberculosa en nuestra población infantil.

Pacientes y métodos

Pacientes estudiados

Se realiza un estudio retrospectivo de los casos diagnosticados de tuberculosis infantil en el Hospital Universitario Sant Joan de Déu de Barcelona durante el período comprendido entre enero-diciembre de 1995. Se trata de un hospital de nivel C, materno-infantil que atiende a una población de 1.500.000 habitantes (área de cobertura Región Sanitaria 5, Costa de Ponent). La búsqueda de los casos se realizó a partir de los diagnósticos de alta hospitalaria, registro nominal de las enfermedades de declaración obligatoria y diagnóstico de las muestras remitidas a laboratorio. El diagnóstico de tuberculosis se realizó por anamnesis y exploración clínica del paciente, reacción de la tuberculina mediante prueba de Mantoux (2UT, PPD RT-23 > 5 mm), estudio radiológico de tórax y análisis microbiológico: baciloscopia, cultivo y detección de secuencias genéticas específicas de *M. tuberculosis* mediante PCR en todas las muestras procesadas de los pacientes con sospecha de enfermedad tuberculosa o interés en descartarla.

Se consideran dos tipos de diagnóstico:

- Diagnóstico de certeza: cultivo positivo a *M. tuberculosis* y/o PCR positiva, esta última con evidencia clínica de enfermedad tuberculosa.

Tabla I Número y tipo de muestras estudiadas

Jugo gástrico	33	Esputo	8
Sangre	6	Líquido pleural	6
Adenopatía	4	LCR	3
Aspirado bronquial	2	Secreción ótica	1
Punción esplénica	1	Total	64

- Diagnóstico clínico: evidencia de clínica de enfermedad tuberculosa con curación por tratamiento con fármacos tuberculostáticos sin confirmación microbiológica.

Método microbiológico

Se realizó tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en los medios de Löwestein-Jensen y medio líquido de Middlebrook. Las muestras fueron decontaminadas (excepto sangre, adenopatías y líquidos estériles) por el método NaOH-N-acetyl-L-cysteína, cultivándose en los medios referidos siguiendo protocolos previamente establecidos⁽⁸⁾. Los aislamientos fueron remitidos al Hospital Clínico de Barcelona para su identificación según las características del cultivo y técnica de hibridación con sondas de ADN (Gen Probe Inc. San Diego, California).

Técnica de PCR

El procesamiento de las muestras por PCR se realizó siguiendo el método y reactivos de Amplicor® *M. tuberculosis complex*. Para su aplicación en muestras diferentes a esputos y líquido pleural se añadieron los siguientes pasos a la preparación de la muestra antes de su procesamiento con el kit Amplicor:

Sangre: 500 µl de sangre recolectada con EDTA eran lavados al momento con una solución de PBS conteniendo menos del 4% de detergente (*Amplicor Whole Blood Specimen Preparation Kit*®).

Jugo gástrico, líquido cefalorraquídeo y aspirado bronquial: microcentrifugación de 1-2 ml de muestra a 12.000 x g durante 5 minutos, descartando el sobrenadante.

Punción esplénica y adenopatías: trituración de la muestra con un homogenizador de fondo cónico con posterior lavado con la solución de PBS referida en los lavados para la sangre.

Resultados

Durante el período de estudio se procesaron 64 muestras (Tabla I) de 41 pacientes, 26 varones y 15 mujeres con edades comprendidas entre 8 meses y 17 años. De éstos, se diagnosticaron de tuberculosis 14 pacientes; 8 eran varones y 6 mujeres (Tabla II). Se descartó la enfermedad por *M. tuberculosis complex* en los restantes 27 pacientes.

La confirmación microbiológica por cultivo y/o PCR se obtuvo en cuatro pacientes; en uno de ellos sólo se identificó el microorganismo por la técnica PCR, existiendo evidencia clínica de enfermedad tuberculosa (Tabla III).

De estos 14 niños se procesaron 28 muestras: 24 jugos gástricos, 1 sangre, 1 esputo, 1 líquido pleural y 1 biopsia ganglio-

Tabla II Distribución de los casos de tuberculosis por edades y sexo

Edad	Varones	Mujeres	Total
0-4 años	4	2	6
5-9 años	2	2	4
10-15 años	1	-	1
16-17 años	1	2	3
Total	8	6	14

nar. En seis de los 14 niños se habían procesado tres o más muestras. En ningún caso fue positiva más de una muestra por enfermo.

La tinción de Ziehl-Neelsen fue positiva en una muestra y el cultivo en tres muestras de tres pacientes. Se detectaron secuencias específicas de *M. tuberculosis complex* en muestras de cuatro pacientes.

De los restantes 27 pacientes con sospecha de enfermedad tuberculosa se procesaron 36 muestras para estudio microbiológico siendo en un caso la baciloscopia positiva, la PCR negativa e identificándose por cultivo *M. kansasii*. En otro caso la baciloscopia y la PCR en sangre fueron negativas creciendo en el cultivo *M. avium intracellulare complex*. Estos dos pacientes estaban coinfectados por el virus VIH-1. La baciloscopia, el cultivo y la PCR fueron negativos en el resto de muestras de los demás pacientes. En el posterior seguimiento clínico se descartó en todos estos pacientes el diagnóstico de tuberculosis.

Discusión

En nuestro medio, la prevalencia de infección tuberculosa en población infantil continúa en descenso después de haber alcanzado una cifra máxima en 1990⁽⁹⁾, pero continuamos con niveles altos de endemia. En nuestro hospital hemos observado esta disminución en la incidencia de enfermedad tuberculosa; así, de los 24 niños diagnosticados en 1994 hemos pasado a 14 en 1995.

Se ha descrito que en la infancia no se observan diferencias por sexo debido a la ausencia de diferencias profesionales o laborales intersexos⁽¹⁰⁾. Otros autores refieren un predominio de varones con diferencias significativas^(11,12). Nosotros encontramos 8 niños frente a 6 niñas pero el escaso número de nuestros pacientes no nos permite extrapolar datos para llegar a una conclusión en este sentido.

Coincidiendo totalmente con la literatura, las edades más susceptibles para la adquisición de enfermedad tuberculosa corresponden en nuestra población al grupo de 0-4 años y adolescencia, con menor prevalencia en el resto de la infancia⁽⁹⁻¹²⁾.

El impacto de la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la epidemiología de la tuberculosis es patente en nuestro medio. Según el Consejo Asesor Clínico del Plan Nacional sobre el SIDA, en España la infección por VIH es en la actualidad el principal factor de riesgo para padecer enfermedad tuberculosa, representando que el 20-45% de los cultivos positivos a *M. tuberculosis* corresponderían a pacientes con

Tabla III Resultados microbiológicos de las 64 muestras procesadas

Muestra	PCR	Baciloscopia	Cultivo
1 Jugo gástrico	Positiva	Negativa	Negativo
1 Jugo gástrico	Positiva	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>
1 Jugo gástrico	Positiva	Positiva	<i>M. tuberculosis</i>
1 Espudo	Negativa	Positiva	<i>M. kansasii</i> *
1 Adenopatía	Positiva	Negativa	<i>M. tuberculosis</i>
1 Sangre	Negativa	Negativa	<i>M. avium intracellulare</i> *
58 Muestras	Negativa	Negativa	Negativo

* Pacientes coinfectados por el virus VIH-1

infección por VIH⁽¹³⁾. En nuestra serie no existía coinfección por el VIH en ninguno de los 14 pacientes diagnosticados de enfermedad tuberculosa pero sí en los dos con micobacterias atípicas.

El problema del diagnóstico confirmatorio mediante métodos microbiológicos es manifiesto. De los 14 niños, sólo en tres (25%) pudimos confirmar el diagnóstico mediante métodos microbiológicos tradicionales (tinción de Ziehl-Weelsen y cultivo). El estudio por PCR fue la técnica más sensible, siendo positiva en cuatro niños (33,3%), resultado similar al 40% encontrado por Smith⁽¹⁴⁾ en pacientes pediátricos, pero notablemente inferior al 83,3% hallado por Delacourt⁽⁴⁾. Este último autor encontraba también que un 38,9% de los niños con infección tuberculosa pero sin enfermedad aparente presentaban alguna muestra positiva por PCR. Este hecho implicará que la PCR no sería útil para diferenciar la infección de la enfermedad. En nuestro caso todas las muestras positivas pertenecían a pacientes con enfermedad.

La mayoría de los diagnósticos (66,7%) tuvo que realizarse por criterios clínicos e histológicos. La baciloscopia sólo fue positiva en una muestra de un niño, por lo que el rendimiento de esta técnica es escaso (un 4%, una muestra de 25 procesadas), lo que corrobora la escasa sensibilidad de esta técnica aplicada a población infantil.

Podemos observar en nuestros resultados que en ningún caso en los que se procesaron varias muestras se obtuvo un resultado positivo en todas ni por cultivo ni por PCR. Debemos remarcar que al igual que para obtener mayor rentabilidad en el cultivo de micobacterias es recomendable y necesario cultivar muestras sucesivas⁽¹⁵⁾ para optimizar el rendimiento de la PCR es muy aconsejable estudiar repetidas muestras del enfermo.

No detectamos ningún falso positivo por PCR en las muestras procesadas en las que posteriormente se descartó el diagnóstico de enfermedad tuberculosa. Es de destacar los resultados de cultivo positivo a micobacterias atípicas y negativos por PCR, lo que confirma su especificidad a nivel de especie. La especificidad encontrada fue del 100%, pero se han descrito en la literatura resultados de falsos positivos con tasas entre el 3 y el 77%⁽¹⁶⁾ por contaminación con amplificadores o por arras-

tre de material genético de unas muestras a otras. Es importante trabajar en condiciones estrictas con una infraestructura arquitectónica adecuada (tres áreas de trabajo separadas) y material exclusivo en cada área, entre otros requisitos. Por último, se ha de realizar una cuidadosa interpretación de los resultados por PCR tanto por el microbiólogo como por el clínico.

El disponer de una técnica con esta especificidad y rapidez es de utilidad tanto desde el punto de vista de atención directa al paciente como desde el enfoque de salud pública en la búsqueda de focos de contagio, pero hay que anotar que la sensibilidad (en nuestra serie), si bien es ligeramente superior al cultivo, no soluciona los problemas de las limitaciones del diagnóstico microbiológico. Esta limitación tanto del cultivo como de la PCR puede deberse a las características en la eliminación transitoria de las micobacterias, que implica ausencia de microorganismos en algunas de las muestras procesadas. Otra causa de falsos negativos por PCR es la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en la muestra clínica⁽¹⁷⁾.

En conclusión, la PCR ofrece una sensibilidad ligeramente superior al cultivo y contribuye a paliar las limitaciones del diagnóstico microbiológico, en especial por ofrecer unos resultados definitivos a las 9 horas de recepción de la muestra, pero continuamos con los problemas inherentes a las características de la enfermedad tuberculosa en los pacientes pediátricos, formas paucibacilares, dificultad de encontrar el límite entre infección y enfermedad o la necesidad de procesar múltiples muestras por eliminación de micobacterias no constante.

El diagnóstico por métodos microbiológicos tradicionales combinado con las nuevas tecnologías moleculares como la PCR es necesario no ya sólo para la confirmación de la enfermedad sino cada vez más para estudios epidemiológicos mediante el estudio del polimorfismo del genoma de *M. tuberculosis*⁽¹⁷⁾ o para el estudio de resistencias a los antimicrobianos utilizados, debido al hecho de los cada vez más frecuentes casos de tuberculosis resistentes a múltiples fármacos⁽¹⁸⁾.

Bibliografía

- Dirección General de Salud Pública. La tuberculosis a Catalunya. Butlletí Epidemiològic de Catalunya. XVI. Julio 1995; 7:85-87.
- Snider DE, Rieder HL, Combs D, Bloch AB, Hyden R, Smith MH. Tuberculosis in Children. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7:271-278.
- Ebersole LL. Acid-fast stain procedures. En: Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American society for Microbiology. Washigton, D.C. 1992. Section 3.3.5.1-3.5.11.
- Delacourt C, Poveda JD, Chureau C, Beydon N, Mahut B, De Blic J, Scheinmann P, Garrigue G. Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1995; 126:703-709.
- Narita M, Matsuzono Y, Shibata M, Togashi T. Nested amplification protocol for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Paediatr* 1992; 81:997-1001.
- Jonas V, Alden M, Curri JJ, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, Wolfe JM, Moore DF. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2410-2416.
- Beavis KG, Lichty MB, Jungking D, Giger O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2582-2586.
- Master RN. En: Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1992. Section 3.3.1-3.16.
- Cayla JA, Galdós-Tanguis H, García Olaya P y cols. La tuberculosis en Barcelona. Informe 1994. Programa de la prevención y control de la tuberculosis de Barcelona. Ed. Ajuntament de Barcelona. Area de Salud Pública. Barcelona, 1995; vol 17.49.
- Morales MM, Llopis A, Sanz SA, Asensi F. Estudio epidemiológico de las formas clínicas de tuberculosis en el Hospital Infantil La Fe de Valencia (1986-1989). *Enferm Infecc y Microbiol Clin* 1991; 9:468-476.
- Vidal ML, Del Cerro MJ, García de Miguel MJ, Borque C, Del Castillo F, De José M, Hortelano J. Tuberculosis pulmonar en la infancia: a propósito de 149 casos. *An Esp Pediatr* 1990; 32:15-19.
- Domínguez P, Cenarro T, Rivas A, Rituerto B, Franco Y, De Juan F. Tuberculosis: estudio epidemiológico y clínico de 268 pacientes en edad infantil. *An Esp Pediatr* 1991; 35:26-30.
- Consejo Asesor Clínico del Plan Nacional sobre el SIDA. Tuberculosis e Infección por VIH. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo. *Plan Nacional sobre el SIDA*. España, 1995; 2:1-6.
- Smith SK, Starke JR, Eisenach K, Ong LT, Denby M. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas de niños utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. *Pediatrics* (ed esp) 1996; 41:73-78.
- Nogales MC, Navarro M, Domínguez MV, Martín Mazuelos E. Valoración de las muestras de jugo gástrico en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar infantil. *An Esp Pediatr* 1995; 42:115-117.
- Noordhoek GT, Kolk AH, Gijne G y cols. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *M. tuberculosis*: a blind comparison among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32:277-284.
- Ausina V, Manterola JM, Gamboa F. Técnicas rápidas de diagnóstico de la tuberculosis. *JANO* 1996; L (1954):404-414.
- Querol JM, García de Lomas J. ¿Debemos introducir la prueba de amplificación enzimática de ADN (PCR) en el diagnóstico de la tuberculosis? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11:61-64.