Kirwan DE, Ugarte-Gil C, Gilman RH, Caviedes L, Rizvif H, Ticona E, Chávez G, Cabrera JL, Matos ED, Evans CA, Moore DA, Friedland JS, The Lymph Node TB Working Group, Perú.
Observación microscópica ensayo de susceptibilidad a fármacos para el diagnóstico rápido de tuberculosis ganglionar y detección de resistencia a fármacos
*Journal of Clinical Microbiology* 2016;54(1):185-9. doi: 10.1128/JCM.02227-15.
Open access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26511739>

**Resumen:** En este estudio, se investigaron 132 pacientes con linfadenopatía. Cincuenta y dos (39.4%) fueron diagnosticados con tuberculosis (TB). El ensayo de observación microscópica de susceptibilidad a medicamentos (MODS) proporcionó un diagnóstico rápido (13 días), preciso (sensibilidad, 65.4%) y pruebas confiables de sensibilidad a medicamentos (DST). A pesar de su menor sensibilidad que la de otros métodos, sus resultados más rápidos y el DST simultáneo son ventajosos en entornos con pocos recursos, lo que respalda la incorporación de MODS en los algoritmos de diagnóstico para la tuberculosis extra pulmonar.

**Texto:** En 2013, el 14,5% de las nuevas notificaciones de tuberculosis (TB) en todo el mundo fueron extra pulmonares, y en ciertas regiones este porcentaje fue mucho mayor. Las manifestaciones inespecíficas de la enfermedad y la infección paucibacilar dificultan el diagnóstico de TB extra pulmonar. El cultivo, el estándar de oro de diagnóstico, permite la identificación a nivel de especie y las pruebas de susceptibilidad a los medicamentos (DST), pero generar resultados lleva varias semanas; Los sistemas automatizados de cultivo líquido son relativamente más rápidos, pero las limitaciones financieras limitan su uso.

El ensayo de susceptibilidad al fármaco de observación microscópica (MODS) es un ensayo de diagnóstico de bajo costo, basado en cultivo líquido para TB. Con una precisión comparable a la de otras técnicas de cultivo, MODS es más rápido, proporciona DST simultáneo y cuenta con la aprobación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la prueba directa de muestras de esputo en niveles bajos -configuración de recursos. MODS diagnostica con precisión la TB del líquido cefalorraquídeo y las muestras pleurales, pero su papel en el diagnóstico de TB de tejido sólido sigue siendo desconocido. Este estudio transversal prospectivo fue diseñado para investigar el uso de MODS para el cultivo de tejido de ganglios linfáticos en un entorno operativo.

Los pacientes ≥18 años con linfadenopatía que requieren muestreo de tejido de diagnóstico fueron reclutados consecutivamente de tres hospitales públicos en Lima, Perú, durante 14 meses. La aprobación ética se obtuvo del Comité de Ética Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, de la Asociación Benéfica PRISMA y del comité de aprobación de ética de cada hospital. Todos los pacientes procuraron su consentimiento escrito. Para cada paciente, se recopilaron datos clínicos y demográficos y se le pidió al médico tratante que diera el diagnóstico más probable. A los pacientes con estado de VIH desconocido se les ofrecieron pruebas.

El muestreo de tejidos se realizó de manera rutinaria, y las muestras se dividieron inmediatamente en tres partes iguales y se procesaron como se describe en la fig 1. MODS se realizó de acuerdo con los procedimientos operativos estándar publicados. El criterio microbiológico para la TB fue la positividad de al menos uno de los siguientes: microscopía de auramina, MODS o cultivo de Löwenstein-Jensen (LJ). Las cepas obtenidas por cultivo LJ se sometieron a DST fenotípico mediante el método de proporción, que se realizó en el laboratorio nacional de referencia de TB, y el ensayo interno de microplacas de tetrazolio (TEMA). Las muestras para evaluación histológica se sellaron en bloques de parafina y se informaron de manera rutinaria. Una vez que finalizó el reclutamiento, se recuperaron los bloques y los portaobjetos se fijaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina, Ziehl-Neelsen (ZN) y manchas periódicas de ácido-Schiff. Tres patólogos independientes cegados a los datos clínicos registraron la presencia de bacilos acidorresistentes (AFB), granulomas y necrosis caseante y dieron un diagnóstico general. Una definición histológica de TB requería concordancia entre dos o más patólogos; cuando no fue posible recuperar los bloques de parafina (n = 11), se obtuvo el informe de patología del hospital y, si se identificó TB, se utilizó. La TB se diagnosticó cuando se cumplieron los criterios microbiológicos y / o histológicos.

Los datos fueron ingresados ​​en excel y analizados por Stata versión 12 (StataCorp). Los datos demográficos nominales y las características de la prueba se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Los tiempos con los resultados se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney. Un valor de p <0,05 se consideró significativo. El acuerdo entre los patólogos se evaluó mediante el uso del coeficiente kappa de Cohen para múltiples clasificaciones; se tomó un valor kappa de ≥0.81 para indicar un acuerdo sustancial.

Ciento cuarenta y cuatro muestras de 132 pacientes fueron analizadas. La demografía de los pacientes se presenta en la Tabla 1. Cincuenta y dos pacientes (39.4%) fueron diagnosticados con TB. Diecinueve fueron positivos por microscopía de auramina, 34 fueron positivos por MODS, 40 fueron positivos por cultivo LJ y 43 fueron positivos por histología; las sensibilidades fueron 36.5, 65.4, 76.9 y 82.7%, y los valores predictivos negativos (VPN) fueron 70.8, 81.6, 87.0 y 89.9%, respectivamente. Los pacientes con VIH fueron más propensos que los pacientes con VIH negativo a tener resultados positivos de microscopía de auramina (65 y 18.8%, respectivamente; P = 0.001). La TB se detectó en 5 de 12 pacientes que ya estaban recibiendo terapia de TB (5 por métodos microbiológicos y 3 por análisis histológico; los 5 eran VIH positivos con recuentos de CD4 + de <250 / mm3). Los médicos sospecharon TB en 48 pacientes con TB positivo y 53 con TB negativo; por lo tanto, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el VPN del diagnóstico presunto de tuberculosis del médico fueron 92.3, 33.8, 47.5 y 87.1%, respectivamente.

Cuarenta y dos pacientes tuvieron uno o más resultados positivos de la prueba microbiológica. MODS, TEMA y el método de proporción detectaron TB resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) en dos pacientes y monoresistencia de isoniazida en un paciente. La MDR-TB fue identificada por TEMA y el método de proporción en un paciente cuyo aislamiento creció en cultivo LJ pero no por MODS. El método de proporción reportó resistencia a isoniazida de bajo nivel en cinco muestras adicionales; todos los demás eran completamente susceptibles a las drogas de acuerdo con todos los métodos utilizados.

Los resultados positivos se comunicaron después de un intervalo medio de 13 días (rango intercuartil [IQR], 11 a 18 días; n = 57) para MODS y 22 días (IQR, 17 a 28 días; n = 78) para cultivo LJ (P < 0.001), y los resultados negativos se comunicaron después de un intervalo medio de 41 días (IQR, 38 a 41 días; n = 186) para MODS y 63 días (IQR, 59 a 64 días; n = 163) para cultivo LJ (P < 0.001). La mediana del tiempo hasta la positividad para los pacientes sometidos a tratamiento de TB fue de 9,5 días (RIC, 6,5 a 21 días; n = 6) para MODS y 15 días (RIC, 15 a 17 días; n = 8) para cultivo LJ. Los resultados de la microscopía de auramina se comunicaron después de 1 día para muestras positivas (IQR, 1 a 2 días; n = 42) y negativas (IQR, 1 a 3 días; n = 145). Como el DST se realizó en lotes, el tiempo hasta los resultados no está disponible; sin embargo, los datos de laboratorio indican tiempos de ensayo de 40 a 45 días para el método de proporción y de 7 a 10 días para TEMA.

Se informó la contaminación para 38 (26,6%; n = 143) ensayos MODS directos y ninguno se realizó después de la descontaminación de la muestra (n = 144). Para el cultivo LJ, 42 (29.4%; n = 143) directos y 4 (2.8%; n = 144) cultivos descontaminados se informaron como contaminados. La sensibilidad y el VPN fueron más altos después de la descontaminación que con el procesamiento directo por todos los métodos microbiológicos utilizados. Este hallazgo persistió cuando las muestras contaminadas se excluyeron del análisis. No hubo diferencia en el tiempo de positividad entre las muestras precontaminadas y procesadas directamente.

Se obtuvieron bloques de parafina de 121 pacientes para una evaluación histopatológica completa, y se alcanzó un diagnóstico de consenso para 117 pacientes. El diagnóstico histológico más frecuente fue TB (34,2%). Se observaron AFB en ocho muestras con tinción de ZN; todos fueron positivos en cultivo y seis fueron positivos por microscopía de auramina. La concordancia inter observador fue alta para la presencia de granulomas (κ = 0,83) y necrosis caseosa (κ = 0,90) pero no AFB (κ = 0,18).

Este estudio es la primera evaluación prospectiva del cultivo MODS para muestras de tejido sólido. MODS detectó con precisión la TB en muestras de tejido de ganglios linfáticos. A diferencia de los datos de muestras respiratorias, MODS fue menos sensible que el cultivo LJ (65.4% versus 76.9%) pero casi el doble de sensible que la microscopía de auramina (36.5%). Comparable a otros estudios de linfadenitis por TB, las sensibilidades de todos los ensayos microbiológicos utilizados fueron más bajas que las reportadas para muestras de esputo, posiblemente debido a la ligera carga bacteriana en el tejido y / o la acumulación de patógenos. En consecuencia, el tiempo hasta los resultados fue más largo que el informado para las muestras de esputo (13 versus 7 días para MODS, 26 versus 22 días para cultivo LJ). Con ambos métodos de cultivo, las tasas de contaminación en las pruebas directas fueron altas. La descontaminación previa de la muestra aumentó la sensibilidad de todas las pruebas de diagnóstico.

MODS proporcionó datos precisos sobre la resistencia a la isoniazida y la rifampicina simultáneamente con el diagnóstico, lo que facilita el inicio oportuno de regímenes apropiados y puede prevenir un mayor desarrollo de resistencia. La tasa de TB-MDR fue similar a las tasas previamente documentadas en Lima (7.7% versus 8.6%), aunque los números de muestra en este estudio fueron pequeños; Se necesitan más pruebas prospectivas de mayores números de muestra para confirmar la precisión de las pruebas de resistencia. Universal DST se recomienda en regiones donde las tasas primarias de TB-MDR superan el 3%, y MODS puede ser particularmente valioso en tales entornos.

Los médicos han sobreestimado las tasas de TB, lo que puede conducir a un sobre tratamiento y retrasos en la obtención de diagnósticos correctos. El acceso universal a MODS tiene el potencial de mejorar los resultados de la tuberculosis extra pulmonar similares a los de la enfermedad respiratoria. El rendimiento de MODS y el cultivo de LJ en paralelo combinarían los beneficios de la rapidez y los datos simultáneos de resistencia a los medicamentos que brinda MODS y la mayor sensibilidad del cultivo de LJ.

Diecinueve pacientes tuvieron resultados microbiológicos e histológicos discrepantes. Hallazgos similares se han informado en otros lugares. Las posibles explicaciones incluyen el fracaso del huésped para generar una respuesta histopatológica típica, la visualización de bacilos muertos en pacientes sometidos a tratamiento de TB y el uso reciente de antibióticos con algún efecto antimicobacteriano. Las diferentes modalidades de prueba pueden ser beneficiosas para estos diferentes grupos de pacientes. La concordancia entre los hallazgos y los diagnósticos de los patólogos fue alta, aunque la concordancia con respecto a la visualización de AFB fue deficiente. Los patólogos desconocían la información clínica, mientras que en la práctica, los hallazgos se interpretan dentro de un contexto clínico y la precisión puede ser mayor que la observada en este estudio.

En conclusión, aunque MODS es menos sensible que el cultivo LJ, puede diagnosticar con precisión la TB del tejido de los ganglios linfáticos significativamente más rápido. También puede detectar correctamente la resistencia a la rifampicina y la isoniazida simultáneamente con el diagnóstico, lo que permite el inicio inmediato del tratamiento dirigido. Ninguna prueba diagnóstica individual para TB tiene todas las propiedades de una prueba ideal, y se deben usar múltiples métodos en el estudio diagnóstico de pacientes con linfadenopatía. Los MODS pueden desempeñar un papel importante en el diagnóstico de TB en entornos con recursos limitados. Estos datos apoyan la expansión de MODS a muestras de tejido sólido dentro de pautas programáticas.

**Expresiones de gratitud:** Otros miembros del Grupo de Trabajo de TB del Ganglio Linfático en Perú incluyen a Johnny Cárdenas Núñez (Departamento de Cirugía de Cabeza y Cuello, Hospital Daniel Alcides Carrión, Callao, Perú), Gustavo Cerrillo (Departamento de Patología, Hospital Nacional Dos de Mayo, Lima, Perú) , Jaime Cok (Departamento de Patología, Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Perú), Rómulo Escobedo (Departamento de Cirugía General, Hospital Nacional Dos de Mayo, Lima, Perú), Margarita Marchino (Departamento de Cirugía de Cabeza y Cuello, Hospital Nacional Arzobispo Loayza, Lima, Perú), Ernesto Nava (Departamento de Patología, Hospital Nacional Arzobispo Loayza, Lima, Perú), y José Luis Saavedra Leveau (Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Departamento de Cirugía de Cabeza y Cuello, Hospital Nacional Dos de Mayo, Lima, Perú).

Agradecemos a todo el personal clínico y los pacientes que participaron en este estudio por su colaboración. Las opiniones expresadas en este informe son las de los autores y no necesariamente las de los financiadores. Los financiadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, o la preparación del manuscrito. No tenemos conflictos de intereses que informar.