

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Comparación entre la reacción en cadena de la
Polimerasa PCR, tinción de Fluorocromo Auramina
“o”, y características histopatológicas en el diagnóstico
de tuberculosis pleural, en muestras histológicas
fijadas en formalina y embebidos en Parafina.**

TESIS

para optar el grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Helí Jaime Barrón Pastor

ASESOR

Mg Mario Monteghirfo Gomero

Lima – Perú

2005

DEDICATORIA

A mis padres

Rolando y Herlinda

A mis hermanos Danilo,

David, Américo,

Arquímedes y Stalin

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que han contribuido a la realización de este estudio, de manera muy especial:

A la Dra. Raquel Oré Sifuentes, Jefa de la Sección Maestría de la Facultad de Medicina y ex Directora del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” UNMSM, por el permanente apoyo académico.

A mi Asesor Mg. Mario Monteghirfo Gomero, por su gran ayuda, asesoría permanente, por el suministro de reactivos y materiales sin las cuales no hubiese sido posible llevar a cabo la siguiente investigación.

Al Dr. Pedro Pablo Díaz Velásquez, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San José, por la ayuda académica y por las facilidades brindadas para la obtención de muestras y el procesamiento de datos.

Al Dr. Carlos Barrionuevo, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.

A la Lic. Julissa Alfaro, del Instituto de Medicina Legal, Morgue Central de Lima, por su gran apoyo en el tratamiento de las muestras.

A la Lic. Cecira García del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San José del Callao, por su valioso apoyo.

ABREVIATURAS.

| | |
|--------------|---|
| TB-PCR | : Reacción en cadena de la polimerasa para tuberculosis |
| AFB-Auramina | : Tinción de fluorocromo auramina para tuberculosis |
| TB | : Tuberculosis |
| INEN | : Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas |
| HSJ | : Hospital San José |
| OMS | : Organización Mundial de la Salud. |
| BCG | : Bacilo de Calmet Guerin |
| VIH | : Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| BAAR | : Bacilo alcohol ácido resistente |
| ELISA | : Ensayo inmunoenzimático. |
| ADA | : Adenosina deaminasa |
| EDTA | : Ácido etileno diamino tetra acético |
| VPP | : Valor predictivo positivo |
| VPN | : Valor predictivo negativo |
| pb | : Pares de bases |
| UV | : Ultravioleta |

CONTENIDO

| | Pág. |
|-----------------------------|------|
| ○ Resumen..... | 01 |
| ○ Abstract | 02 |
| ○ Introducción..... | 03 |
| ○ Antecedentes | 07 |
| ○ Materiales y métodos..... | 09 |
| ○ Resultados..... | 16 |
| ○ Discusión..... | 26 |
| ○ Conclusiones..... | 30 |
| ○ Recomendación | 31 |
| ○ Bibliografía..... | 32 |

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue estudiar la relación entre el diagnóstico clínico de la tuberculosis con los resultados de las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (TB-PCR) y la tinción de fluorocromo auramina (AFB-Auramina) en muestras histológicas de biopsias pleurales embebidas en parafina. Se usaron 48 bloques de parafina obtenidos de los archivos de Patología del Hospital San José del Callao y del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas; 30 de los cuales tenían diagnóstico clínico de tuberculosis y 18 presentaron diagnóstico diferente de tuberculosis. De los 30 casos con diagnóstico clínico de tuberculosis, 29 resultaron ser TB-PCR positivos. Los 18 casos negativos para tuberculosis resultaron también negativos para TB-PCR. La sensibilidad y el valor predictivo negativo para TB-PCR fueron de 96,7% y 94,7%. La sensibilidad y el valor predictivo negativo para AFB-Auramina fueron de 58,6% y 56,7%. En ambos casos el valor predictivo positivo fue de 100%. TB-PCR ha resultado ser un método muy sensible en el diagnóstico de tuberculosis en muestras histológicas embebidas en parafina.

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the relationship between the clinical diagnosis of tuberculosis, the results of tuberculosis polymerase chain reaction (TB-PCR) and fluorochrome auramine "O" staining in histological embedded tissues of pleural biopsy. Were used 48 formalin-fixed paraffin-embedded tissue obtained from the archives of the Department of Pathology from Hospital San José del Callao and Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. 30 cases were clinically diagnosed with tuberculosis and 18 having another diagnosis different from tuberculosis. 29 of 30 cases having tuberculosis were TB-PCR positive. All of 18 negative cases were TB-PCR negative. The sensibility and the negative predictive value of TB-PCR were 96,7% and 94,7% respectively. On the other hand the sensibility and the negative predictive value of AFB-Auramine were 58,6% and 56,7%. The positive predictive value was 100% in both cases. TB-PCR is a very sensitive method for TB diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded pleural biopsies.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis aunque es curable sigue siendo aun una de las principales causas de muerte por agentes infecciosos en el mundo. La tuberculosis ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de emergencia global, debido principalmente al sinergismo entre el bacilo tuberculoso y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La magnitud de este problema se ve reflejado por la aparición de nuevos casos, que según datos de la OMS son de 10 millones en el 2002 y casi 12 millones de nuevos casos proyectados al 2005. (1,2,3,4)

Mycobacterium tuberculosis es frecuentemente adquirido en etapas tempranas de la vida, como una infección aguda y con desarrollo de inmunidad, formación de granuloma y calcificación. Después sigue un largo periodo de latencia, que puede reactivarse en algunos individuos. La OMS ha reportado que un tercio de la población mundial está infectado con tuberculosis (TB) de los cuales más de 8 millones por año presentan la enfermedad activa, con dos millones de muertes al año. (1,2)

El *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch es el agente etiológico de la tuberculosis. Se trata de un bacilo aerobio estricto, ácido-alcohol resistente, no tiene movilidad, es de crecimiento lento; esta bacteria se inactiva con radiación ultravioleta y/o temperaturas por encima de 60° C. Varias especies similares integran el complejo *M. tuberculosis*: *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. El bacilo BCG (*M. bovis* atenuado) también puede ocasionar una enfermedad en pacientes inmunocomprometidos, la que no se puede distinguir clínicamente de la tuberculosis. La infección se da principalmente a través de secreciones respiratorias que son expulsadas del paciente en el momento de la tos. En el periodo de incubación, que puede variar desde el momento de la infección hasta 90 días, la bacteria crece lentamente en los macrófagos, pudiendo diseminarse a otras partes del cuerpo del hospedero. En la mayoría de casos, esta enfermedad es controlada por la

inmunidad celular, de los cuales un 10% desarrollará la enfermedad activa a lo largo de su vida (19).

Se ha determinado que *Mycobacterium tuberculosis* presenta la tasa anual mas alta de mortalidad entre todos los microorganismos patógenos. El incremento de la incidencia de TB en las últimas dos décadas es principalmente debido a la coinfección con el VIH y la aparición de TB multidrogoresistente. Además, debido a su crecimiento lento y su alta virulencia, esta bacteria presenta serias dificultades para su diagnóstico (18).

Los últimos datos de la OMS que datan del año 2003 indican una prevalencia de 15,4 millones de infectados lo que representa una tasa de 245/100,000 habitantes. Esto representa 8,8 millones de casos de nuevos de tuberculosis cada año. La mortalidad actual de esta enfermedad es de 2 millones de muertes anuales, de las cuales 98% ocurren en países subdesarrollados. Esta situación podría agudizarse más debido a que las pruebas convencionales de diagnóstico de TB demoran 8 semanas, ocasionando un retraso en el tratamiento, por lo que la rápida identificación es esencial para el manejo del paciente.

En el Perú, en el año 2004 se registraron 64 276 pacientes con diagnóstico de tuberculosis y la prevalencia de TB en nuestro país va en aumento. La tasa de incidencia es de 66,39 por cada 100 000 habitantes comparable con Bolivia, Ecuador, Guyana y Haití.

El diagnóstico de la TB depende de la historia clínica del paciente, exámenes bacteriológicos, pruebas de rayos X, test de tuberculina entre otros. El diagnóstico etiológico de TB depende de la demostración microscópica de los bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR), y de su aislamiento e identificación en medios de cultivo (23).

A pesar de los grandes avances en los métodos de diagnóstico, la tuberculosis es todavía identificada por los antiguos procedimientos tales como la tinción de Ziehl-Neelsen y por el cultivo en el medio de Lowestein–Jensen

que todavía son considerados como estándar de oro en el diagnóstico de TB; debido a que los procedimientos modernos son aun muy costosos (16,23).

Aunque la baciloscopía o tinción BAAR en esputo es un método de diagnóstico simple y relativamente rápido, presenta problemas en cuanto a su sensibilidad (50%), ya que son necesarias cantidades mayores de 10 000 bacilos / mL para su detección; así, casi la mitad de los casos de TB activa pueden tener baciloscopía negativa. Esta sensibilidad puede estar aun más disminuida en los casos de biopsias embebidas en parafina.

Las pruebas de cultivo de esputo son más sensibles (80 a 96%), sensibilidad que disminuye si se trata de muestras con menor carga bacilar tales como liquido cefalorraquídeo, orina o de biopsias. El principal inconveniente de este método es el tiempo de incubación para la recuperación de este microorganismo que puede demorar hasta 8 semanas.

Actualmente, las técnicas moleculares permiten la identificación de micobacterias a nivel de especie en aquellas muestras donde los métodos de cultivo y otras técnicas convencionales de detección son negativas.

En los últimos años se han desarrollado poderosas herramientas moleculares para el diagnóstico de TB a partir de una amplia variedad de muestras.

Entre las técnicas moleculares para el diagnóstico de tuberculosis tenemos el uso de sondas de DNA, uso de sondas ribosomales basada en rRNA y los distintos métodos de amplificación de genes basados en PCR.

La identificación de *Mycobacterium spp* usando sondas de DNA es un método laborioso, pero es de gran ayuda para confirmar los resultados de los cultivos. Este método puede presentar una baja sensibilidad, especialmente cuando se trata de identificar el bacilo a partir de especímenes clínicos, ya que se requiere más de 10 000 organismos en la muestra para dar positividad.

Comercialmente se pueden encontrar distintas sondas de DNA incluyendo sondas para *Mycobacterium avium*.

En los últimos años, se ha explorado bastante en el uso de sondas rRNA, habiéndose desarrollado kits de diagnóstico que permiten distinguir distintas especies tales como *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M.gardoniae*, etc. Este método puede mejorar de 10 a 100 veces la sensibilidad de los métodos que usan sondas de DNA; además, éstas sondas de rRNA se pueden usar directamente a partir de muestras clínicas en la mayoría de los casos. Sin embargo, el mínimo nivel de detección del bacilo es todavía del orden de 100 microorganismos(16).

Últimamente, se esta haciendo mas extensivo el uso de métodos de amplificación de genes tanto para la identificación del bacilo tuberculoso a partir de cultivos y muestras clínicas como para la detección molecular de resistencia a drogas. Así tenemos la técnica de la PCR con gran sensibilidad, que en condiciones óptimas puede detectar de 1 – 10 microorganismos. Con los métodos de extracción de DNA disponibles, es posible ahora la identificación de micobacterias a partir de cualquier muestra biológica (17).

La técnica de PCR IS6110 es la que presenta mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*. (5,6).

Actualmente se usan muchos genes y secuencias para su amplificación. Así, tenemos secuencias repetitivas y no repetitivas. IS6110 de 123 pb, es una secuencia repetitiva frecuentemente usada; en tanto que otra secuencia, la rRNA16S de 306pb, es una secuencia no repetitiva (7).

El objetivo de este estudio fue investigar la relación entre el diagnóstico clínico de tuberculosis pleural con los resultados de las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para tuberculosis (TB-PCR) y la tinción de fluorocromo auramina (AFB-Auramina) en muestras histológicas de biopsias pleurales embebidas en parafina.

ANTECEDENTES

Las secuencias de inserción (IS) en el bacilo tuberculoso, son elementos genéticos que no codifican marcadores fenotípicos, pero si codifican para su propia transposición; las IS son pequeñas secuencias de 200 a 1 500 pb.

IS6110 es una secuencia repetitiva de la familia IS, se encuentra con muy pocas excepciones en todos los miembros del grupo de *Mycobacterium tuberculosis* complex y está aparentemente restringido a este grupo de microorganismos (7, 8). Esta secuencia, que tiene 1335 pb, se encuentra mas o menos aleatoriamente distribuido alrededor del genoma, su número va desde 0 a 30.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de micobacterias en tejidos embebidos en parafina es un método reciente; este método puede dar rápida y valiosa información para un mejor tratamiento del paciente con sospecha clínica de tener tuberculosis. Mas aun, en estos casos no es posible obtener otras muestras frescas para cultivo, dado que la biopsia pleural es un procedimiento invasivo, por lo que el diagnóstico depende principalmente de las características histopatológicas y de la detección microscópica del bacilo tuberculoso. (7).

En los últimos años se viene haciendo estudios para acortar el tiempo de diagnóstico de tuberculosis; especialmente en los casos de muestras obtenidas por biopsia, donde el diagnóstico aun representa un gran desafío. Se ha evaluado diversos métodos, desde pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA) hasta las distintas pruebas moleculares disponibles (20,21,22).

Babu, en el año 2001 hizo una evaluación de PCR para detectar TB en líquido pleural, encontrando una sensibilidad de 70% y una especificidad de

100%, en este estudio se hizo además una comparación con otras herramientas diagnósticas para TB tales como la tinción BAAR y el test de adenosina deaminasa (ADA). (9)

También en el año 2001, Boruh pretende desarrollar una prueba simple, rápida y sensible para diagnosticar TB a partir de diversas muestras clínicas tales como esputo, aspirado bronquial, orina, líquido cefalorraquídeo. Boruh usó las secuencias de inserción IS6110 y la secuencia IS990. Se encontró una sensibilidad y especificidad de 96,5% y 95,3 %. (10)

Otro estudio realizado por Hasaneen el año 2003 presenta la técnica de PCR como un método rápido de diagnóstico en biopsias pleurales antes de haber recibido el tratamiento convencional de embebido en parafina. Hasaneen encontró una sensibilidad de 90% y una especificidad de 100% para PCR. En este estudio se recomendaba el uso de PCR para diagnóstico de TB en combinación con otros métodos tales como cultivo y examen histopatológico. (11).

Park y col, en el año 2003 hicieron una comparación entre PCR y características histopatológicas en especímenes embebidos en parafina. Park encontró gran variación de sensibilidad y especificidad de acuerdo a las diversas condiciones histopatológicas. Al compararlo con el diagnóstico clínico, Park encontró que PCR tenía una sensibilidad y especificidad de 78% y 88% respectivamente. (4)

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

Todos los procedimientos fueron realizados en condiciones de esterilidad en una cabina de Bioseguridad de Clase II.

1.1 Obtención de los especímenes histológicos.

Los especímenes que fueron incluidos para este trabajo estaban conformados por 30 muestras de biopsias pleurales fijadas en formalina y embebidas en parafina, diagnosticadas histológicamente como pleuritis crónica, pleuritis tuberculoide, reacción granulomatosa. Los especímenes fueron obtenidos de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San José del Callao (HSJ) y correspondían a muestras procesadas durante el año 2004. Además se incluyeron en este estudio 18 muestras de biopsias pleurales con diagnóstico negativo de TB pleural o algún otro tipo de lesión que sugiere diagnóstico de TB, todas procedentes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) cuyo diagnóstico que fue verificado por el médico patólogo del INEN.

1.2. Revisión de Historias Clínicas.

Se revisaron los archivos del año 2004 del Servicio de Anatomía Patológica del HSJ y del INEN para verificar el diagnóstico histológico en cada uno de los casos.

1.3. Reactivos.

Los reactivos usados fueron de grado analítico

1.3.1. Reactivos para el desparafinado de muestras y la extracción de ADN.

Xilol QP

Etanol Absoluto
Agua destilada.
Trizma Base.
Acido clorhídrico
Acido etilen diamino tetra acético (EDTA)
Tween 20
Proteinasa K

1.3.2. Reactivos para la amplificación de DNA, para un volumen final de 25 μ L.

Mezcla de dNTPs (A, C, G, T) 200 μ M
Cebador IS6110 F 150pM CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG
Cebador IS6110 R 150pM CCTGCGAGCGTAGGCGTTCGG
Taq polimerasa 1 U
MgCl₂ 1.5 mM
PCR buffer 1X
10mM tris-HCl,
50 mM KCl,
0,8 % nonidet P40
(pH 8,8 a 25°)

1.3.3. Reactivos para la electroforesis y tinción

Buffer TBE 1X
89 mM tris base
89 mM ácido bórico
2 mM EDTA
Agarosa
Bromuro de etidio 1 mg / mL
Buffer de carga 6X
0,25% azul de bromofenol
0,25% xylencianol
40% (W/V) sucrosa en agua
Estándar de tamaño molecular de 100 pb.

1.4. Equipos y materiales

1.4.1. Equipos:

Cabina de Flujo laminar de clase II LABCONCO
Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400
Fuente de Poder HSI PS1500 Hoefer Scientific Instruments
Micrótomo Leica
Cámara para electroforesis horizontal Fotodyne
Transiluminador UV FOTO/Phoresis Model 1-1430
Microscopio de Fluorescencia Hund
Pipeta Eppendorf Digital Pippete 4710
Microcentrífuga Eppendorf 5415 C
Centrífuga Heraeus Mod Labofuge 200
Horno de Microondas Chef Samsung Modelo MW 630WB
Congeladora a -70°C Sanyo Ultra Low -85°C
Estufa Incubadora Memmer BE-200 y BE-400

1.4.2. Materiales

Tubos eppendorf
Tubos para PCR
Puntas para micropipetas
Probetas
Tubos cónicos con tapa rosca
Pipetas pasteur estériles y descartables.

2. **MÉTODOS**

2.1. Tinción de los cortes histológicos con Auramina "O"

Se realizaron cortes histológicos seriados de 5 μm de espesor de cada una de las muestras. Para prevenir contaminación cruzada en las subsiguientes muestras, se usaron cuchillas descartables nuevas en cada caso, y se limpio el micrótomo con etanol al 100% después de haber realizado el corte de cada muestra. (2)

Se realizó la tinción del fluorocromo auramina "O" en cortes histológicos para micobacterias según el procedimiento descrito por Hagemann-Herman

La tinción se basa en la unión inespecífica del colorante fluorescente a un sustrato. Este mecanismo es comparable con la tinción clásica de Ziehl-Neelsen en la cual la envoltura cerosa de la membrana de las micobacterias impide la decoloración de la auramina-fenol por los ácidos una vez que los colorantes ya han sido absorbidos por la membrana.

Procedimiento de Tinción:

- Cubrir los preparados con solución de fenol-auramina por 30 minutos a 56°C
- Enjuagar cuidadosamente con agua
- Diferenciar en Alcohol - ácido clorhídrico hasta la decoloración por unos 15 segundos.
- Enjuagar con agua (se puede hacer una contra tinción, en caso sea necesario)
- Sumergir durante 5 segundos en una solución de permanganato de potasio
- Enjuagar con agua.
- Introducir por 1 segundo en solución de azul de metileno de Löffler.
- Enjuagar con agua
- Deshidratar hasta xilol
- Realizar el montaje con bálsamo de Canadá

La observación se realiza con un microscopio de fluorescencia usando el filtro azul. Las micobacterias presentan fluorescencia amarilla sobre fondo púrpura.

2.2. Desparafinado de la muestra

Se efectuaron secciones de 20 μm de las muestras embebidas en parafina. El desparafinado se realizó con xilol y etanol, siguiendo el siguiente protocolo:

Se agregó 500 μL de xilol y se mezcló en un rotador plano por 15 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugó por 5 minutos a 5 000 rpm y se separó cuidadosamente el sobrenadante con pipetas pasteur estériles descartables. Se repitió el paso anterior.

Se agregó 500 μL de etanol absoluto frío (-20°C) se mezcló brevemente en un vortex y se llevó a la centrifuga a 5 000 rpm por 5 minutos. Se repitió este paso. Se descartó el sobrenadante y se llevó a secar el precipitado a 65°C .

2.3. Extracción de DNA

Al precipitado obtenido en el paso anterior se le añadió 100 μL de un buffer de digestión conformado por:

| | |
|-----------------|-----------------------------|
| Tris HCl pH 8,5 | 50 mM |
| EDTA pH 8,0 | 1 mM |
| Tween 20 | 0,5% |
| Proteinasa K | 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

Se mezcló en un vortex y se le cubrió con 100 μL de aceite mineral y se llevó a 56°C por 4 horas.

Se elevó la temperatura a 95°C por 10 minutos para inactivar la proteinasa K.

2.4. PCR IS6110

Se utilizó 5 μL de las muestras de DNA de *Mycobacterium* obtenidos en el paso anterior. La amplificación PCR IS6110 se realizó según el método descrito por Park y col. (4). El termociclador fue programado de la siguiente manera:

denaturación inicial por 5 minutos a 94°C y luego 35 ciclos de 94°C por 1 minutos, 68°C por 1 minutos y 72°C por 2 minutos.

2.5. Análisis de los productos de PCR IS6110

Los productos de PCR IS6110 fueron analizados mediante electroforesis en agarosa al 2%. La tinción de los geles se realizó con bromuro de etidio. Se visualizaron las bandas de 123 pb empleando un transiluminador UV.

2.6. Análisis de la información.

Se evaluó la especificidad y la sensibilidad de los métodos comparados con los criterios estándares de diagnóstico clínico de TB. Asimismo se obtuvieron el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) para cada uno de los métodos de diagnóstico. (29,30)

Sensibilidad. Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

Especificidad. Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

Valor predictivo positivo. Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test.

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

Valor predictivo negativo. Es la probabilidad de que un sujeto con resultado negativo en la prueba diagnóstica, esté realmente sano.

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{FN} + \text{VN}}$$

VP = Verdadero positivo

VN = Verdadero negativo

FN = Falsos negativos

FP = Falsos positivos

RESULTADOS

De los 48 casos estudiados 30 fueron clínicamente diagnosticados como tuberculosis pleural, de acuerdo a los datos obtenidos de la revisión de las historias clínicas del año 2004. De las 30 muestras diagnosticadas como TB se encontró que 20 (67 %) correspondieron a diagnóstico histopatológico de pleuritis tuberculosis; y siguiendo el orden de frecuencia 4 casos (13 %) pleuritis crónica, 3 casos (10 %) presentaron pleuritis reaccional inespecífica, 2 pacientes (7 %) presentaron pleuritis crónica inespecífica, y un paciente (3 %) presentó pleuritis granulomatosa tuberculosa. Tal como se muestra en la figura 2.

Los 18 casos restantes tuvieron diagnóstico clínico e histológico diferente de TB, de acuerdo a los datos de revisión de historia clínica de los archivos del INEN del año 2004.

De los 20 casos que fueron diagnosticados histológicamente como pleuritis tuberculosa, se encontró que 16 (80%) fueron positivos para la tinción AFB-Auramina, y todas ellas 20 (100%) fueron positivas para IS6110 TB-PCR (tabla 1 y figura 1).

Se encontró que de los 4 casos que tenían diagnóstico histopatológico de pleuritis tuberculosa, ninguna (0%) fue positiva para la prueba de AFB-Auramina, en tanto que todas (100%) fueron positivas para IS6110 TB-PCR (tabla 2). Del mismo modo, entre los 3 casos diagnosticados como pleuritis reaccional inespecífica ninguna (0%) fue positiva para AFB-Auramina y todas (100%) presentaron positividad para IS6110 TB-PCR (tabla 1).

Entre los 2 casos de pleuritis crónica inespecífica, solo 1 (50%) fue AFB-Auramina positiva, en tanto que los 2 casos (100%) fueron IS6110 TB-PCR positivas; tal como se muestra en la tabla 1.

Finalmente el único caso de pleuritis granulomatosa tuberculosa presentó diagnóstico negativo para AFB-Auramina y diagnóstico positivo para IS6110 TB-PCR.

En la figura 3 se muestra la correlación entre los resultados del diagnóstico clínico y los resultados de la prueba de IS6110 TB-PCR, se encontró una sensibilidad de 96,7%, una especificidad del 100%, un VPN de 94,7% y un VPP del 100% para la prueba de IS 6110 TB-PCR.

En la figura 4 se presenta la correlación entre los resultados del diagnóstico clínico y los resultados de la prueba de AFB – Auramina; se ha encontrado una sensibilidad de 58,6%, una especificidad del 100%, un VPN de 56.7% y un VPP del 100%..

En la figura 5 se muestran los resultados comparativos de las sensibilidad de ambas pruebas IS6110 TB PCR y AFB-Auramina en la que se observa una marcada diferencia (40%). Asimismo en la figura 6 se observa una diferencia de casi 40% entre los VPN de ambas pruebas en estudio.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

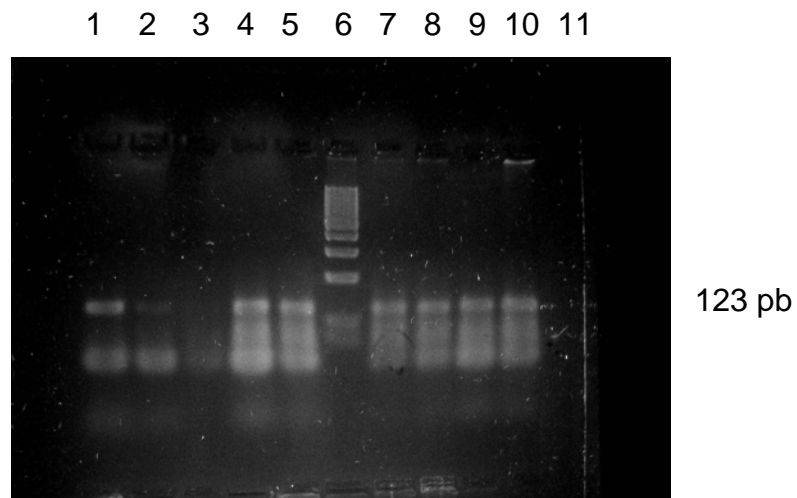


Figura 1. Los carriles 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10 presentan resultados positivos. Carril 3 con resultado negativo. Carril 4 control positivo a partir de cultivo. Carril 6 marcador de tamaño molecular de 100 pb. Carril 11 control negativo.

DISCUSIÓN

Las estadísticas presentadas por la OMS, revelan que un tercio de la población mundial está infectada con tuberculosis resultando de 8 a 10 millones de nuevos casos de tuberculosis activa cada año, lo cual significa un gran desembolso de dinero de parte de los gobiernos y sus programas de salud en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad (1,2).

Los métodos de diagnóstico bacteriológicos tradicionales se basan principalmente en el método de tinción de Ziehl-Neelsen y el cultivo para el aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. La técnica de Ziehl-Neelsen, que presenta el mismo principio que la tinción de auramina aunque es rápida y muy barata tiene muy baja sensibilidad especialmente en muestras histológicas embebidas en parafina. El cultivo, que es bastante sensible ya que se requiere solamente la presencia de 10 a 100 microorganismos viables por muestra, es un procedimiento relativamente largo que puede tomar de 4 a 8 semanas para completarse. Además, el cultivo puede presentar una sensibilidad menor en muestras histológicas, menor aun cuando el paciente ha sido tratado parcialmente, ya que se requiere de la presencia de microorganismos viables para su aislamiento en los medios de cultivo (1,2, 3, 4, 9).

En los últimos años ha aparecido pruebas moleculares que superan largamente la sensibilidad y la especificidad de las pruebas tradicionales para el diagnóstico de tuberculosis a partir de especímenes histológicos. Entre estos métodos se incluyen a la técnica de PCR y otras técnicas de amplificación que detectan DNA de *Mycobacterium tuberculosis* (4,5,12).

Existe en la literatura diversos reportes que muestran la utilidad de la técnica de PCR como método de diagnóstico rápido de tuberculosis en diversos tejidos (4,5,8,12,13,14); en nuestro caso todos los especímenes

estudiados corresponden a biopsias pleurales con diversos diagnósticos histológicos.

En este estudio se analizaron 48 muestras de biopsias pleurales de pacientes fijadas en formalina y embebidas en parafina, 30 de las cuales tenían diagnóstico clínico de tuberculosis. También se analizaron 18 muestras de biopsias pleurales de pacientes que presentaron diagnóstico clínico e histológico diferente de tuberculosis.

En esta investigación no se usó el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* como referencia para TB-PCR tampoco se usó este criterio para la tinción AFB-Auramina, debido que las biopsias pleurales no fueron enviadas para cultivo. En contraste, se empleó el diagnóstico clínico como referencia comparativa tanto para TB-PCR y para la tinción AFB-Auramine.

En este estudio se encontró que la sensibilidad de la técnica de TB-PCR fue de 96,6%, y una especificidad de 100%, en tanto que el valor predictivo positivo fue de 100% y el valor predictivo negativo fueron de 94,7% respectivamente, para especímenes histológicos provenientes de biopsias pleurales.

Un estudio publicado por Park y col (4) en Corea mostró una sensibilidad de 78% y una especificidad de 88% para TB-PCR; además, Park encontró un valor predictivo positivo de 93% y un valor predictivo negativo de 66%. Estos resultados difieren de los obtenidos en este estudio, lo que puede explicarse por la variedad de muestras empleadas en el ensayo de Park quien incluyó muestras de diversos sitios anatómicos tales como pulmón, pleura, tejidos blandos y tejido gastrointestinal incluyendo hígado, estómago y duodeno entre otros que tenían sospecha clínica de tuberculosis; en tanto que en nuestra investigación todos los especímenes provenían de biopsias pleurales.

Por otro lado, los resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba TB-PCR encontrados en el presente trabajo son muy similares a los obtenidos por Isik Somuncu y col, quienes obtuvieron una sensibilidad y especificidad de

90% y 100% respectivamente (5). Cabe mencionar que el estudio de Isik Somuncu se basó en tejidos que presentaban infección granulomatosa necrotizante.

En una investigación publicada el año 2003 (5), Fukunaga y col. realizaron un estudio comparativo entre la técnica de tinción de BAAR y PCR en tiempo real, para el cual emplearon 30 muestras embebidas en parafina que tenían diagnóstico de lesión granulomatosa. En ese estudio se demostró que el tratamiento con formalina y con xilol, que son reactivos empleados en el procesamiento de muestras histológicas puede disminuir drásticamente la sensibilidad de las técnicas de tinción para micobacterias tales como Ziehl-Neelsen y la tinción de auramina-rodamina. Todo esto explicaría la baja sensibilidad para la prueba AFB-Auramina en muestras embebidas en parafina como la que se ha encontrado en nuestra investigación (figura 5) que presenta 40% menor sensibilidad que TB-PCR.

En un estudio realizado por Punkae y col. (7) en Tailandia y publicado este año, se muestra una sensibilidad de 29.26% y especificidad de 61.11%. valores bastante bajos para PCR en biopsias embebidas en parafina. Estos resultados difieren grandemente con los resultados obtenidos en el presente estudio. La explicación de esta diferencia es que Punkae emplea solamente biopsias de piel. Además, Punkae empleó un método de PCR basado en 16S rRNA, en contraste a nuestro estudio que se ha empleado la secuencia IS 6110.

Finalmente, para la confirmación de estos diagnósticos es necesario realizar las pruebas de tinción BAAR y el cultivo, pero se sabe que los procedimientos de tinción para BAAR tales como Ziehl-Neelsen y AFB-Auramina presentan baja sensibilidad en muestra histológicas y además no existe disponibilidad para procesar dichos cultivos. Por lo tanto se debe considerar seriamente el empleo de técnicas de biología molecular como métodos rápidos de ayuda diagnóstica. Sin embargo, dado que este es un procedimiento de diagnóstico todavía laborioso en nuestro medio por lo que se

debe seguir estrictos controles para evitar contaminaciones cruzadas y / o falsos positivos.

CONCLUSIONES

1. Se ha encontrado una alta sensibilidad (96,7%), para la técnica de IS6110 TB-PCR.
2. Se ha encontrado una baja sensibilidad (58,6%), de la tinción de fluorocromo auramina en biopsias pleurales embebidas en parafina.
3. Se ha estandarizado un procedimiento de extracción de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de biopsias pleurales fijadas en formol y embebidas en parafina.
4. Se ha demostrado la utilidad de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR sobre todo en aquellas muestras de biopsias pleurales donde no es posible identificar el agente etiológico de la tuberculosis ya sea por la demora en su aislamiento por cultivo o por la baja sensibilidad de los procedimientos de tinción.

RECOMENDACIÓN

1. IS6110 TB-PCR, debe ser usado en combinación con otros métodos de diagnóstico para iniciar el tratamiento temprano al paciente

BIBLIOGRAFÍA

1. Buck G E, O'Hara L C and Summersgill J T. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30:1331-1334.
2. Jimenez David , MD; Diaz Gema, MD; Perez-Rodriguez Esteban, MD. Diagnosis of Pleural tuberculosis. Chest. 2001;121:3:1005
3. Douglas B. Young. Mycobacteria research in the post-genomic era. Microbiology 2002;148:2915-2917
4. Do Youn Park, MD; Jee Yeon Kim, MD; Kyung Un Choi, MD; Jin Sook Lee, MD; Chang Hun Lee, MD; Mee Young Sol, MD; Kang Suek Suh, MD. Comparison of Polymerase Chain Reaction with Histopathologic Features for Diagnosis of Tuberculosis in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Histologic Specimens. Arch Pathol. Lab Med 2003;127:326-330
5. Isik Somuncu Johansen, Vibeke Ostergaard Thomsen, Arne Forsgren, Birgit Fischer Hansen, and Bettina Lundgren. Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Specimens with Necrotizing Granulomatous Inflammation by Strand Displacement Amplification. J Mol Diagn 2004; 6:231-235.
6. Lodha R, Kabra SK. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. The Indian Journal of Pediatrics. 2004; 71(3): 221-227.
7. Punkae Mahaisavariya, et al. Detection and Identificación of *Mycobacterium* Species by Polimerase Chain Reaction (PCR) from Paraffin-Embedded Tissue Compae to AFB Staining in Pathological Sections. J Med Assoc Thai 2005;88(1):108-13

8. Niemann Stefan et al. Stability of Mycobacterium tuberculosis IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (2): 409-412.
9. Babu S. Nagesh, MD; Shobha Sehgal, MD; Surinder K. Jindal, MD, FCCP and Sunil K. Arora, PhD. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Pleural Fluid. *Chest*. 2001; 119:6:1737-1741.
10. Boruh M. , Sajduda A., Pawowska I., McFadden J. J., Dziadek J.. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples using insertion sequences IS 6110 and IS 990 Tuberculosis. 2001;81(4):271-278
11. Nadia A. Hasaneen, MD, PhD; Maysaa E. Kaki, MD, PhD; Hala M Shalaby, MD; and Ahmad S. El-Morsi, MD, PhD. Polymerase Chain Reaction of Pleural Biopsy Is a Rapid and Sensitive Method for the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusion. *Chest*. 2003; 124:4:2105-2111.
12. Zink A R, A G Nerlich. Molecular Strain Identification of The Mycobacterium Tuberculosis Complex In Archival Tissue Samples. *J Clin Pathol* 2004;57:1185-1192
13. Min-Sun Cho, Shi Nae Lee, Sun Hee Sung and Woon Sup Han Comparison of Ziehl-Neelsen Stain and TB-PCR on Detection of Mycobacterium tuberculosis in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues of Chronic Granulomatous Inflammation *The Korean Journal of Pathology*. 2003;37: 379-83 (ABSTRACT)
14. Cataloluk Osman, Tekin Karsligil and Nurhayat Bayazit. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Amplification Method for Mycobacterium Tuberculosis Complex on Samples from Different Sources. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 329-331.

15. Fukunaga Hajime, Tomoyuki Murakami, Toshikazu Gondo, Kazuo Sugi, and Tokuhiko Ishihara. Sensitivity of Acid –Fast Staining for *Mycobacterium tuberculosis* in Formalin – Fixed Tissue. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:994-997
16. Katoch V.M.. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. Review Article. *Indian J Med Res*. October 2004;120:418-428.
17. Pa-Fan Hsiao, MD, Chin-Yuan Tzen MD, PhD, Hsiu-Chin Chen, MD, and Hsin-Yi Su, MD. Polymerase Chain Reaction Based Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Tissues Showing Granulomatous Inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *International Journal of Dermatology* 2003; 42:281-286.
18. Van Kooyk Y, Appelmelk B, Geijtenbeek TB. A fatal attraction: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol Med*. 2003;9(4):153-9.
19. Nikki M. Parrish et al. Review. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*. 1998; 6:3:107-112
20. Chan E. D., Heifets L., M. D. Iseman Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review *Tubercle and Lung Disease*. 2000; 80(3):131–140
21. Niyaz Ahmed & Seyed E. Hasnain. Genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Old threats & new trends Review Article. *Indian J Med Res* 2004;120:207-212.
22. Philip D Butcher. Microarrays for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2004 84, 131-137.
23. Sociedad Argentina de Pediatría, Comité Nacional de Neumología, Comité Nacional de Infectología Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil *Arch.argent.pediatr* 2002; 100(2)

24. Lounma Tazi, Barry Kreiswirth, Christian Carriere, Michel Tibayrenc. 2002. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and its relevance to the surveillance and control of TB: an e-debate. *Infection, Genetic and Evolution* 2. 2002;153-158.
25. Al-Hajjaj M. S., Gad-El-Rab M. O., Al-Orainey I. O., Al-Kassimi F. A. Improved sensitivity for detection of tuberculosis cases by a modified And-TB ELISA test *Tubercle and Lung Disease*.1999;79(3):181–185
26. Malcom D Yates, Francis A Drobniowski and Stuart M. Wilson 2002. Evaluation of a rapid PCR – Based Epidemiological Typing Method for Routine Studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002;712-714.
27. Morishi Ogusku, Mauricio; Ignez Salem, Julia. Analysis of different *primers* used in the PCR method: diagnosis of tuberculosis in the State of Amazonas, Brazil. *J. Bras. pneumol.* 2004; 30 (4) July/Aug.
28. Schulz Stephan, et al. Species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues: frequent detection of nontuberculous mycobacteria. *Modern Pathology*. 2004; 1–9.
29. Altman D.G., Bland J.M. *Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity.* *BMJ* 1994; 308: 1552.
30. Altman D.G., Bland J.M. *Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values.* *BMJ* 1994; 309: 102.